

立命館大学審査博士論文

細胞性粘菌の G タンパク質共役型受容体を介した

細胞間調整機構に関する研究

(Study of Cell-to-Cell Coordination via G-Protein-coupled  
Receptor in *Dictyostelium discoideum*)

2014 年 9 月

(September, 2014)

櫻井俊輔

(Shunsuke Sakurai)

主査：長野正道 教授

(Principal referee: Professor Seido Nagano)

# 目次

項目	頁
図目次	2
表目次	3
要約	4
Abstract	5
第1章 本研究の背景と目的	6
第1節 細胞性粘菌とは何か	6
第2節 細胞性粘菌を研究に活用する優位性	7
第3節 本研究の背景	8
第4節 本研究の目的	17
第2章 cAMP 自励振動に関する分子ネットワークと適応	18
第1節 cAMP の自励振動モデルの提案	18
第2節 数値実験によるモデルの検証	21
第3節 提案モデルの G タンパク質のキネティクス	23
第3章 細胞性粘菌の動力的解析	28
第1節 新しい細胞動力学モデル	28
第2節 数値実験の結果	30
第3節 生物学的実験事実と、数値実験との比較検討	33
第4章 結論	38
謝辞	40
付録 A 細胞内分子ネットワークのロバスト性	41
付録 B マイクロ微細構造を用いた細胞間コミュニケーション	45
B1 マイクロ微細構造の構築法	45
B2 実験方法	46
B3 細胞間コミュニケーション	47
引用文献	49

## 図目次

- 図 1.1.1 細胞性粘菌の生活環
- 図 1.2.1 細胞性粘菌アメーバの凝集時に見られるパターンの一例
- 図 1.3.1 細胞性粘菌アメーバの cAMP に対する走化性
- 図 1.3.2 細胞性粘菌アメーバの cAMP に対する走化性(模式図)
- 図 1.3.3 細胞内 cAMP と細胞外 cAMP の振動
- 図 1.3.4 Martiel and Goldbeter の cAMP 受容体の感作・脱感作に基づくモデル
- 図 1.3.5 Halloy らの cAMP 受容体へ G タンパク質の効果を導入したモデル
- 図 1.3.6 Tang and Othmer の cAMP 受容体へ G タンパク質の効果を導入したモデル
- 図 1.3.7 Laub と Loomis によるモデル
- 図 1.3.8 Laub と Loomis によるモデルの時間発展
- 図 1.3.9 Maeda らが改良したモデル
- 図 1.3.10 Maeda らが改良したモデルの時間発展
- 図 1.3.11 Nagano による細胞動力学スキーム
- 図 2.1.1 Scheme I
- 図 2.1.2 Scheme Ia
- 図 2.1.3 受容体の適応を表す関数である  $R_a(x)$  の計算例
- 図 2.2.1 Scheme I の時間発展
- 図 2.2.2 Scheme Ia の時間発展( $\alpha=20$ )
- 図 2.2.3 Scheme Ia の時間発展( $\alpha=11$ )
- 図 2.2.4 Scheme Ia の時間発展( $\alpha=10$ )
- 図 2.3.1 cAMP 振動と適応の分子ネットワーク
- 図 2.3.2 図 2.3.1 に示す分子ネットワークの時間発展
- 図 3.2.1 Wild Type 細胞(細胞数 : 127 細胞)における時間発展
- 図 3.2.2 持続する自発的な cAMP 振動の閾値の存在を示す図
- 図 3.3.1 各変異体の細胞内分子ネットワーク
- 図 3.3.2 各変異体による凝集シミュレーション画像
- 図 3.3.3 空間に配置した 1 細胞における cAMPe の時間発展
- 図 3.3.4 37 細胞における細胞集団での中心細胞の cAMPe の時間発展
- 図 B1.1 アガロース上に作製したマイクロ微細構造(左)とその拡大図(右)
- 図 B1.2 アガロース上に作製したマイクロ微細構造の模式図
- 図 B3.1 マイクロ微細構造内に粘菌細胞を閉じ込めた画像
- 図 B3.2 図 B3.1 を対数スケールでカラーリングした画像
- 図 B3.3 計算機上での粘菌細胞の細胞間コミュニケーションのシミュレーション

## 表目次

表 2.2.1	Scheme I 及び Scheme Ia パラメータ値
表 2.3.1	図 2.3.1 に示すモデルの速度定数
表 3.2.1	細胞動力学に用いたパラメータ
表 A.1	Maeda らが改良したモデルのロバストネス
表 A.2	Scheme I のロバストネス
表 A.3	Scheme Ia のロバストネス
表 A.4	Scheme Ia へ G タンパク質の適応を導入したモデルのロバストネス

## 要約

単細胞アメーバの一種である細胞性粘菌は、単細胞状態から多細胞状態への移行が飢餓処理で制御可能であることから、単細胞生物と多細胞生物を繋ぐ仕組みを効率的に研究できるモデル生物として大変有用な存在となっている。

多細胞化誘導の鍵は細胞外にパルス的に分泌される cAMP(環状アデノシンーリン酸)と 4 種類の cAMP 受容体であることは早くから知られていた。そして 2000 年以降になると、遺伝子破壊株の凝集実験、1 分子計測、FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)実験など実験手法の目覚ましい進展の結果、cAMP パルスの発生に関与する多くの分子の存在が明らかとなった。しかし、それらの分子がどのように組合わさることで cAMP パルスを発生させているのか、その仕組みが明らかにされていなかった。そこで本研究ではこれまでに蓄積された実験的な知見を基に、実測される 7 分周期の cAMP パルスを生み出すことのできる分子ネットワークモデルを提案した。更にこの分子ネットワークモデルを各細胞内に組み込んだ多細胞動力学シミュレーションを実行し、各種遺伝子破壊株の凝集パターン、cAMP パルス変調の定量的再現にも成功した。

本研究の結果、細胞内の 2 種類のネガティブフィードバック機構の存在と cAMP 受容体を介した細胞間 cAMP 産生同期が安定した cAMP パルス生成のキーであることが判明した。その中でも特に G タンパク質サブユニットの分割、再結合のキネティックスが cAMP パルス生成にとって必要不可欠な存在となっていることも明らかにした。

## Abstract

*Dictyostelium discoideum* exists for much of its life cycle as a unicellular amoeba. Under conditions of starvation, however, a population of these amoebae can transition from the unicellular state to a multicellular state. This unique life cycle makes *D. discoideum* a model that is well suited for the study of developmental processes of multicellular organisms.

Here we propose a new molecular network scheme that can produce spontaneous cAMP (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate) oscillations that cycle approximately every seven minutes in *D. discoideum*. This spontaneous cAMP oscillation involves four kinds of cAMP receptors that regulate the development from the unicellular to the multicellular state. By reconstructing this molecular network scheme using a cellular dynamics simulation we successfully reproduced, *in silico*, the experimentally observed aggregation patterns of *D. discoideum*.

Our study clarified that there are two kinds of negative feedback loops in the molecular network and the mutual synchronization of cAMP production between cells via cAMP receptor signaling, which enable a robust cAMP oscillation that guides development. Specifically, G-protein coupled receptor signaling plays a key role in establishing these negative feedback loops.

Since G-protein coupled receptors often play key roles in cellular communication in various kinds of organisms, we believe the results of this study could significantly expand our understanding of molecular mechanisms responsible for establishing and maintaining biorhythms required for coordinated intercellular signaling.

## 第1章 本研究の背景と目的

### 第1節 細胞性粘菌とは何か

細胞性粘菌は単細胞アメーバ状態で土壤中にて生活している細胞で、とてもユニークな生態と巧みな生存戦略を持っていることが知られている。細胞性粘菌の餌は大腸菌などのバクテリアであるが、餌がなくなり飢餓状態に陥ると、数百～数十万という細胞性粘菌アメーバが、シグナル伝達物質である環状アデノシンリン酸(cAMP)を介して、凝集行動を起こし、単細胞から多細胞体へと変化する。凝集した多細胞体は動物状態であるマウンド及び移動体を経て、植物状態である子実体へと変化する。子実体は多くの胞子を持ち、胞子は辺りに水分があると発芽して、再び細胞性粘菌アメーバとなる。細胞性粘菌は、アメーバ状態、動物状態、植物状態という 3 つの状態を繰り返して生活している生物である(Kessin, 2001)。

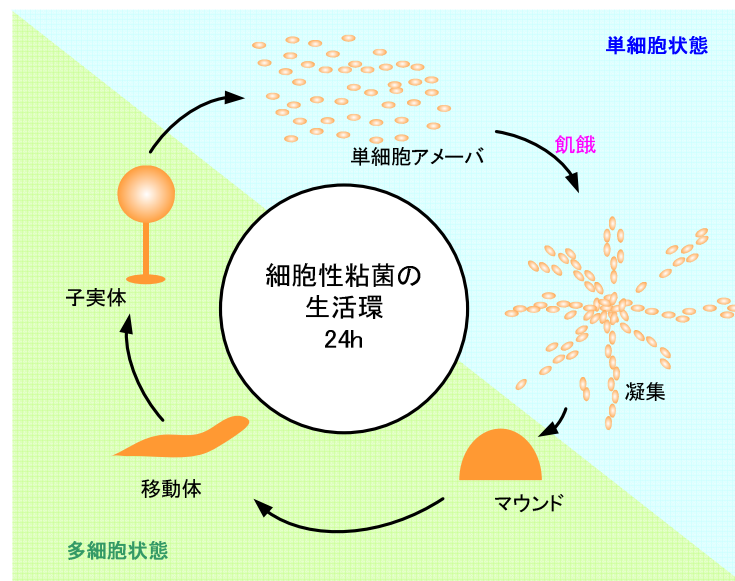


図 1.1.1 細胞性粘菌の生活環。細胞性粘菌アメーバは飢餓状態になるとシグナル伝達物質である cAMP を介して凝集行動を起こして多細胞化し、マウンド状態を経て、移動体となる。この後さらに、子実体となり、その中の胞子が飛び散り発芽することで単細胞アメーバ状態へと戻る。細胞性粘菌は 24 時間でこの生活環を繰り返して生きている。

## 第2節 細胞性粘菌を研究に活用する優位性

細胞性粘菌は、生物学的、数理的な研究に適している生物の 1 つである。細胞性粘菌を研究に用いる優位性として、その「扱いやすさ」が大きい。細胞性粘菌は、単細胞アメーバが移動体、子実体へ変化する生活環は 24 時間で完了し、その発生過程を効率よく観察することができる。また、通常の菌体を扱う培地類で培養でき、培養、発生に用いる温度が 22℃で、特別な培養設備を導入することも無く、実験的にも扱いやすい。また、細胞性粘菌アメーバは 1 倍体で、形質転換体を得やすく、その手法が確立していることも、大きな利点になっている(Kessin, 2001)。

最も大きな優位性として、細胞内シグナル伝達物質である cAMP が細胞内だけでなく、細胞外へも分泌され、cAMP 振動を発生させることで、細胞間コミュニケーションを実現していることである。この特徴は、生物学的にも、数理的にも非常に重要で、cAMP 振動を解析することで単細胞から多細胞体を形成する際の基本的な原理を解明することが可能であることを示している。

細胞性粘菌は凝集を行う際、図 1.2.1 に示すようなスパイラルパターンや同心円パターンを形成することも知られており、パターン形成の格好の研究材料となっている(Lee *et al.*, 2001; Palsson and Cox, 1996; Halloy *et al.*, 1998; Sawai *et al.*, 2005)。また、細胞性粘菌は米国国立衛生研究所(NIH, National Institute of Health)が選んだモデル生物の 1 つでもある(NIH homepage: <http://www.nih.gov/science/models/>)。

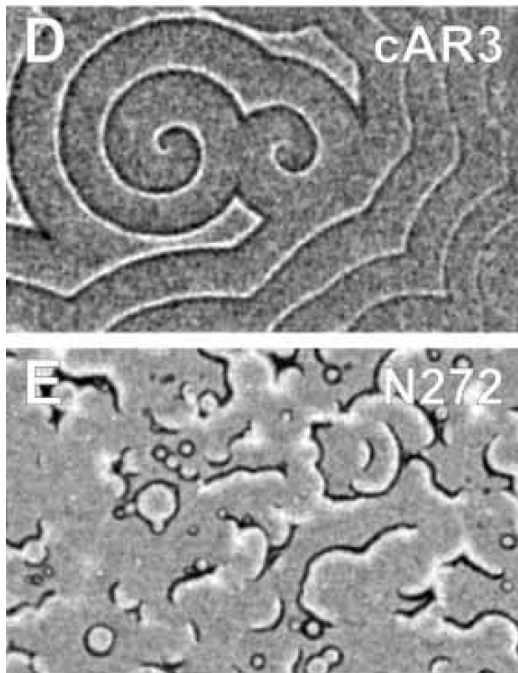


図 1.2.1 細胞性粘菌アメーバの凝集時に見られるパターンの一例. (上)スパイラルパターン(Dormann *et al.*, 2001, Fig.1 D より引用), (下)同心円パターン(Dormann *et al.*, 2001, Fig.1 E より引用).



### 第3節 本研究の背景

図 1.3.1 はマイクロニードルの先端から  $1\mu\text{M}$  cAMP が放出され、細胞性粘菌アメーバがマイクロニードルの先端へと移動している様子である。これは、図 1.3.2 のように説明される。マイクロニードルの先端から高濃度の cAMP が放出されたとき、近接する細胞性粘菌アメーバは、この高濃度の cAMP を感知し、高濃度方向へと移動すると共に、細胞内で cAMP が合成され、細胞外へと cAMP を分泌する。分泌された cAMP は、後続の細胞性粘菌アメーバが感知する。この一連の動作を繰り返すことで、図 1.3.1 のような走化性運動をしている。

この走化性運動を暗視野顕微鏡で測定すること(Gross *et al.*, 1976; Siegert and Weijer, 1989) によって第 1 章第 2 節に示す図 1.2.1 のような凝集時にパターン形成が見られる(Dormann *et al.*, 2001) 。凝集パターンがスパイラルパターンや同心円パターンを形成するのは、細胞密度の違い(Lee *et al.*, 1996) や、cAMP を感知する受容体などへ変異を導入する (Dormann *et al.*, 2001) ことで現れることが知られている。

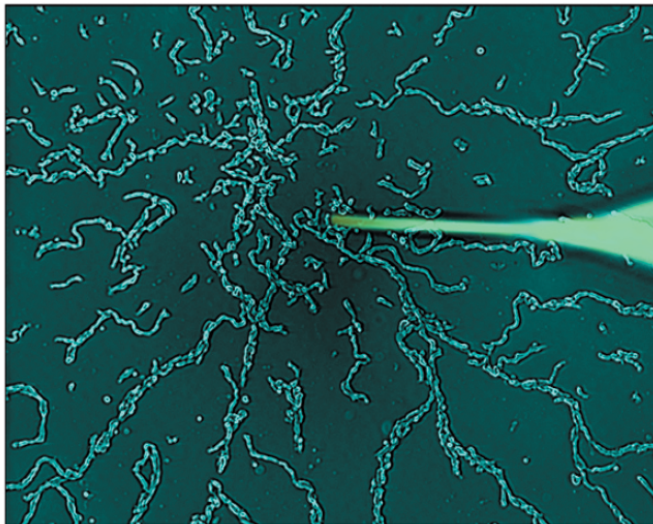


図 1.3.1 細胞性粘菌アメーバの cAMP に対する走化性。マイクロニードルの先端から  $1\mu\text{M}$  cAMP が放出され、細胞性粘菌アメーバがマイクロニードル先端へと移動している様子。(Insall, 2003, Fig.1 (left panel)より引用)

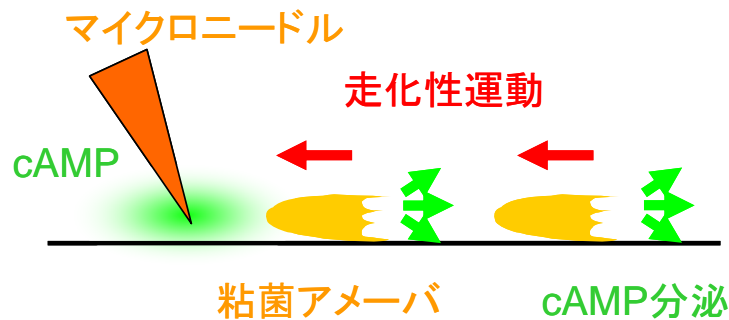


図 1.3.2 細胞性粘菌アメーバの cAMP に対する走化性(模式図). マイクロニードルの先端から cAMP が放出され、放出された cAMP を感知して、高濃度方向へ細胞性粘菌アメーバが移動する. 高濃度方向へ移動する細胞性粘菌アメーバ自身も cAMP を分泌し、後続の細胞性粘菌アメーバが感知する. この一連の動作を繰返すことで走化性運動を行っている.

このため、細胞性粘菌の各種変異体を作製して、凝集時のパターン形成や、cAMP の波を観測することによって、その細胞内反応系に関する理解を深めるという研究が広く行われている(例えば、Sawai *et al.*, 2005; Dormann *et al.*, 2001) .

このように細胞性粘菌アメーバは、外部から来る cAMP を感知することで細胞間でのコミュニケーションを行っており、この cAMP の波を用いた細胞性粘菌の研究は、1970 年ごろから現在に至るまで行われている(例えば、Gross *et al.*, 1976; Dormann *et al.*, 2001) .

図 1.3.3 に示すように、cAMP パルスは約 7 分周期の振動である. cAMP は、まず、細胞内で合成され、その一部が細胞外へと分泌されるために、振動するピークは、細胞内 cAMP と細胞外 cAMP がほぼ同時に振動しているか、もしくは細胞内 cAMP、細胞外 cAMP の順で振動している(Gerisch and Wick, 1975) .

近年の細胞性粘菌における変異体作製に関連する技術は飛躍的な進歩を見せ、これまで関連が無いと考えられていた酵素群についても、cAMP 走化性応答に関与するものと考えられるようになった(Kuspa and Loomis, 1992; Firtel, 1996; Loomis, 1996) .

そして cAMP 受容体に関する研究として、次の 2 つの事実が明らかとなった.

- (1) 飢餓状態となり凝集初期段階となった細胞性粘菌アメーバは G タンパク質が結合した受容体の一種である cAMP 受容体(cAR1)を発現させる. (Klein *et al.*, 1988) .
- (2) 細胞外 cAMP が cAMP 受容体である cAR1 へ結合した際、G タンパク質の構造変化によって  $G_{\alpha}$  サブユニットと  $G_{\beta\gamma}$  サブユニットへと解離して、 $G_{\alpha}$  サブユニットがアデニル酸シクラーゼ(ACA)を活性する. 活性化された ACA によって、細胞内アデノシン三リン酸(ATP)から cAMP が合成される(Kesbeke *et al.*, 1988;

Kumagai *et al.*, 1991; Janetopoulos *et al.*, 2001) .

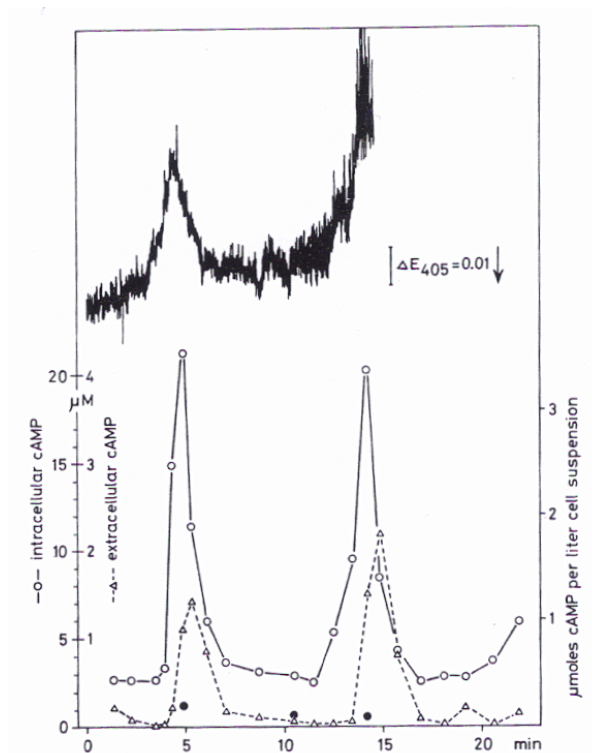


図 1.3.3 細胞内 cAMP と細胞外 cAMP の振動(Gerisch and Wick, 1975 より引用) . 丸印と実線の組み合わせで細胞内 cAMP の振動を示し, 三角印と破線の組み合わせで細胞外 cAMP の振動を示している. 細胞内 cAMP と細胞外 cAMP がほぼ同時に振動しているか, もしくは細胞内 cAMP, 細胞外 cAMP の順で振動し, その振動周期は約 7 分前後であることが分かる.

一方で, cAMP 受容体に関するモデルの研究もなされてきた.

Martiel and Goldbeter は, 細胞性粘菌における cAMP 受容体の感作・脱感作に基づくモデルを構築して研究した(図 1.3.4)(Martiel and Goldbeter, 1987) . Halloy らは, Martiel and Goldbeter の構築したモデルを発展させて, G タンパク質の効果を導入したモデルを構築して研究した (図 1.3.5) (Halloy *et al.*, 1998) . また, Tang and Othmer も, Halloy らのモデルとは異なる cAMP 受容体モデルへ G タンパク質の効果を導入したモデルを構築して研究した (図 1.3.6) (Tang and Othmer, 1995) .

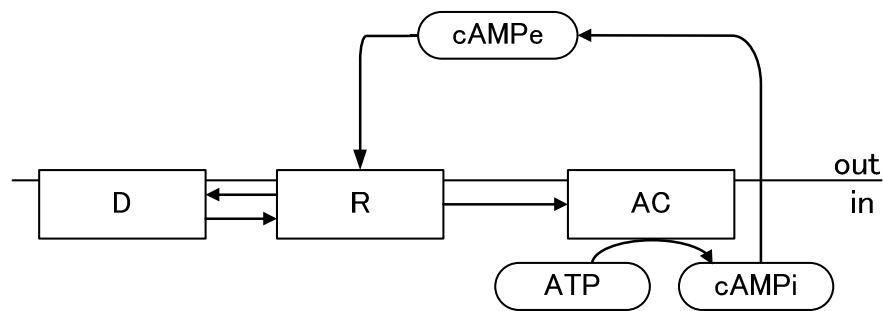


図 1.3.4 Martiel and Goldbeter の cAMP 受容体の感作・脱感作に基づくモデル(Martiel and Goldbeter, 1987) . 細胞内で活性化された AC によって ATP から cAMP が合成され, 細胞外へと分泌される. 分泌された cAMP は cAMP 受容体で感知され, 再び AC が活性化される (R : 活性化状態の cAMP 受容体, D : 不活性化状態の cAMP 受容体, AC : アデニル酸シクラーゼ, ATP : アデノシン三リン酸, cAMPi : 細胞内 cAMP, cAMPe : 細胞外 cAMP)

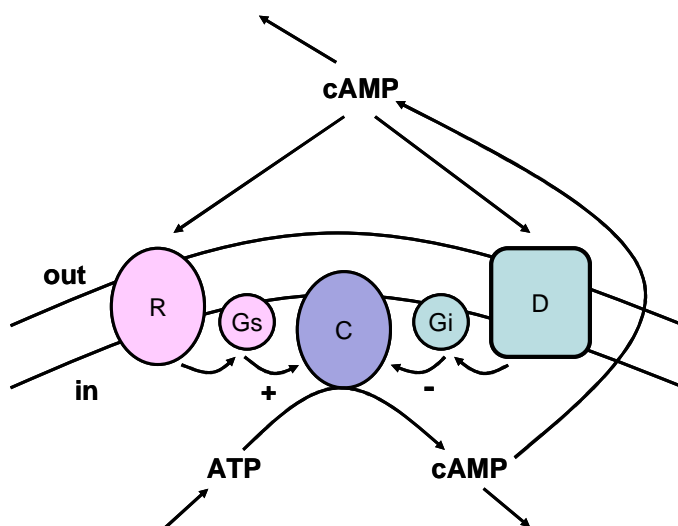


図 1.3.5 Halloy らの cAMP 受容体へ G タンパク質の効果を導入したモデル(Halloy *et al.*, 1998). 図 1.3.4 のモデルへ G タンパク質の効果を導入したモデル. (R : 活性化状態の cAMP 受容体, D : 不活性化状態の cAMP 受容体, Gs : アデニル酸シクラーゼを活性化できる G タンパク質, Gi : アデニル酸シクラーゼを阻害する G タンパク質, C : アデニル酸シクラーゼ, ATP : アデノシン三リン酸, cAMP : 環状アデノシン三リン酸)

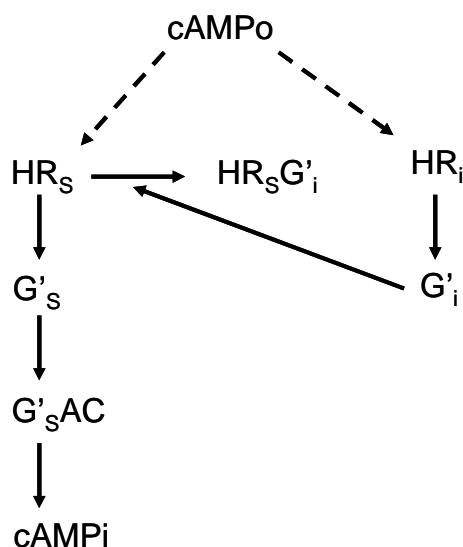


図 1.3.6 Tang and Othmer の cAMP 受容体へ G タンパク質の効果を導入したモデル (Tang and Othmer, 1995) . 細胞外 cAMP が cAMP 受容体へ結合して G タンパク質を介して細胞内 cAMP が合成されるモデル. (HR<sub>s</sub>: 活性化経路における cAMP と受容体との複合体, G'<sub>s</sub>: 活性化刺激性 G タンパク質, G'<sub>s</sub>AC: 活性化状態のアデニル酸シクラーゼ, HR<sub>s</sub>G'<sub>i</sub>: HR<sub>s</sub> と G'<sub>i</sub> との複合体, HR<sub>i</sub>: 不活性化経路における cAMP と受容体との複合体, G'<sub>i</sub>: 活性化阻害性 G タンパク質, cAMP<sub>o</sub>: 細胞外 cAMP, cAMP<sub>i</sub>: 細胞内 cAMP)

Martiel and Goldbeter のモデル, Halloy らのモデル, Tang and Othmer のモデルはいずれも cAMP 受容体に関する機能や構造に着目したもので, 細胞性粘菌の細胞内分子ネットワークについては考慮されていないものであった. Halloy らのモデル (Halloy *et al.*, 1998) は, G タンパク質のキネティクスを導入しているものの, Martiel and Goldbeter のモデル (図 1.3.4) を基礎としており, 近年の生物学的な実験事実を反映していなかった. また, Tang and Othmer のモデル (Tang and Othmer, 1995) についても, G タンパク質のキネティクスを導入しているものの, Gi と Gs という 2 種類の G タンパク質を用いたモデルを仮定しており, こちらも近年の生物学的な実験事実を反映したものではなかった. これより, cAMP 受容体へ G タンパク質のキネティクスを導入した細胞内の分子ネットワークについての研究も必要とされていた.

また, 細胞性粘菌の生物学的な研究については, cAMP 受容体に関するものの他に, 細胞内ネットワークに関して, 次の 3 つの事実が明らかとなった.

- (1) 細胞外 cAMP はホスフォジエステラーゼ(PDE)によって迅速に分解され, 一方で, 細胞内 cAMP は細胞内ホスフォジエステラーゼ(RegA)によって迅速に分解される (Malchow *et al.*, 1972; Shaulsky *et al.*, 1998) .
- (2) cAR1 受容体はアデニル酸シクラーゼだけでなく, MAP(mitogen-activated protein)キナーゼである ERK2 をも活性化させる (Segall *et al.*, 1995; Knetsch *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 1997) .
- (3) 細胞内 cAMP の蓄積がタンパクキナーゼ A(PKA)を活性化し (Mutzel *et al.*, 1987; Simon *et al.*, 1992) , 活性化された PKA が ERK2 の活性を阻害する (Knetsch *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 1997) .

そこで, Laub と Loomis は cAMP 受容体に関する 2 つの事実と, 細胞内分子ネットワークに関する 3 つの事実を整理結合した. そして, ERK2 は RegA の活性を阻害し, PKA は cAR1 受容体の活性を阻害するのだという仮定をして, cAMP を生成, 分泌する細胞内ネットワークモデルを構築した(Laub and Loomis, 1998) .

Laub と Loomis が構築したモデルでは, 細胞外 cAMP 生成に関する, 次の 8 つの分子(cAR1 ; cAMP 受容体, ACA ; アデニル酸シクラーゼ, cAMPi ; 細胞内 cAMP, PKA ; プロテインキナーゼ A, ERK2 ; mitogen-activated protein(MAP) kinase, Reg A ; 細胞内ホスフォジエステラーゼ, PDE ; 細胞外ホスフォジエステラーゼ)を用いた(図 1.3.7).

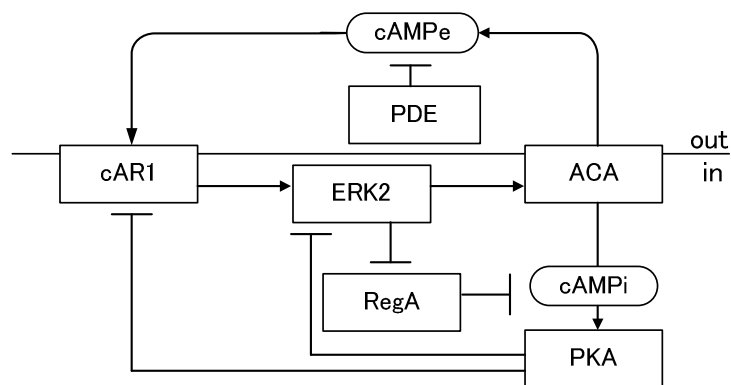


図 1.3.7 Laub と Loomis によるモデル(Laub and Loomis, 1998) . 細胞外 cAMP は ACA から合成される. cAR1 が ERK2 を活性化し, ERK2 が ACA を活性化するモデル. ここで, cAR1 : cAMP 受容体, ERK2 : mitogen-activated protein (MAP) kinase, ACA : アデニル酸シクラーゼ, cAMPi : 細胞内 cAMP, PKA : プロテインキナーゼ A, RegA : 細胞内ホスフォジエステラーゼ, cAMPe : 細胞外 cAMP, PDE : 細胞外ホスフォジエステラーゼを示す.

その構築された細胞内分子ネットワークの時間発展を図 1.3.8 に示す.

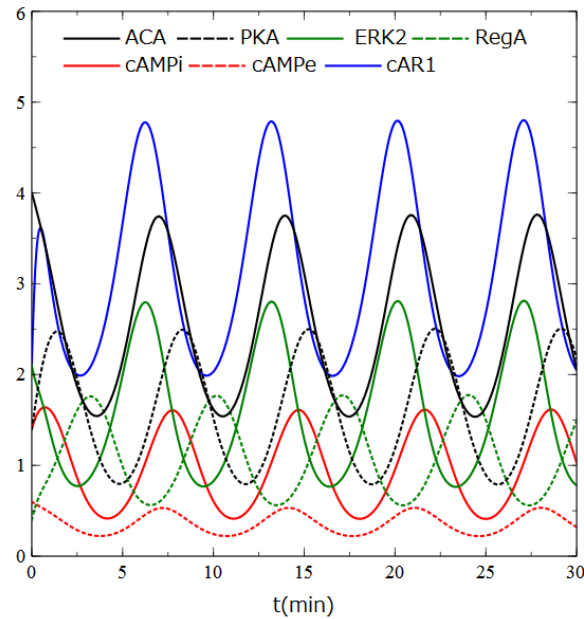


図 1.3.8 Laub と Loomis によるモデルの時間発展.

図 1.3.8 に示す Laub と Loomis によるモデルの時間発展は、これまでの細胞性粘菌の生物学的な実験事実を正しく反映しているように見えたが、1 つ問題があった。

これまでに、Gerisch らによって報告されている cAMP ピークの振動順は、細胞内 cAMP、細胞外 cAMP の順であった(Gerisch and Wick, 1975)が、Laub と Loomis によって構築されたモデルでは、ピークの振動順が、細胞外 cAMP、細胞内 cAMP の順であった(Laub and Loomis, 1998)。

その後、Maeda らは、ERK2 は ACA を直接的に活性化することは無く、ERK2 は RegA を通じて細胞内 cAMP レベルの調節を行っていることを明らかにし、Laub と Loomis が提案したモデルを実験事実に合わせて修正した(Maeda *et al.*, 2004)。この Maeda らによって修正されたモデルを図 1.3.9 に示し、その時間発展を図 1.3.10 に示す。

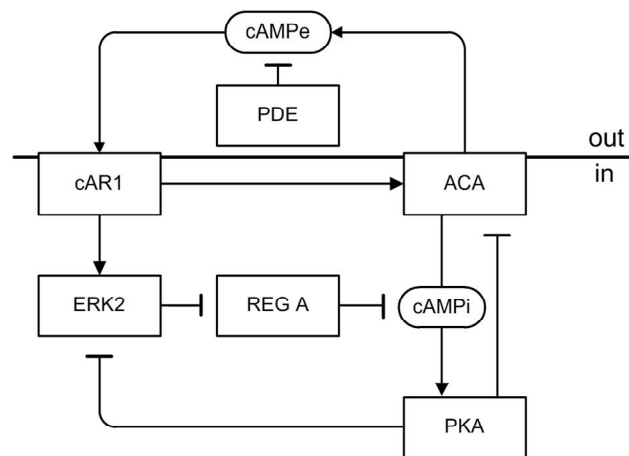


図 1.3.9 Maeda らが改良したモデル(Maeda *et al.*, 2004). 細胞外 cAMP は ACA から合成される. cAR1 が ACA を活性化し, ERK2 は RegA を介して cAMPi を調整するモデル. ここで, cAR1 : cAMP 受容体, ERK2 : mitogen-activated protein(MAP) kinase, ACA : アデニル酸シクラーゼ, cAMPi : 細胞内 cAMP, PKA : プロテインキナーゼ A, RegA : 細胞内ホスフォジエステラーゼ, cAMPe : 細胞外 cAMP, PDE : 細胞外ホスフォジエステラーゼを示す.

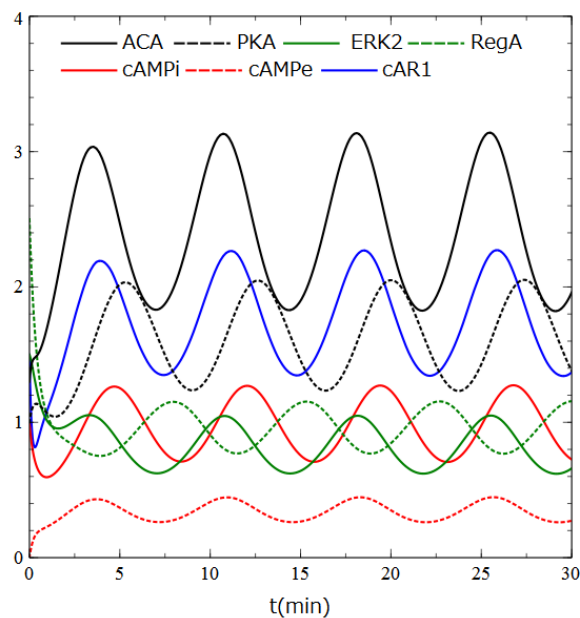


図 1.3.10 Maeda らが改良したモデルの時間発展.

図 1.3.10 より, 分子が生成される順は, ACA, ERK2, 細胞外 cAMP(cAMPe), cAR1, 細胞内 cAMP(cAMPi), PKA, RegA の順であり, Laub と Loomis によるモデルと同様に, 依然として cAMPi と cAMPe のピーク順が生物学的に正しいものではなかった.



加えて、これまでの生物学的な実験事実から、(1) cAR1 は G タンパク質共役型受容体であること(Klein *et al.*, 1988), (2) cAR1 は G タンパク質を介して ACA を活性化すること(Kesbeke *et al.*, 1988; Kumagai *et al.*, 1991) , の 2 点が明らかとなっている. しかし, Laub と Loomis によるモデル (Laub and Loomis, 1998) において, G タンパク質のキネティクスを導入しておらず, Maeda らが改良したモデル (Maeda *et al.*, 2004) においても, ERK2 に関する分子ネットワークは改良されたものの, 依然として G タンパク質に関するキネティクスを導入してはいなかった.

これまでの Laub と Loomis が構築したモデル(図 1.3.7) や, Maeda らが改良したモデル (図 1.3.9) のいずれにしても, 細胞内外の区別があるものの, 数理的には「単細胞系での細胞内の分子ネットワーク」である. しかし, 実際の細胞性粘菌を用いた生物学的な実験は, 多細胞系に関してであり, これはつまり, 計算機上でのモデリングとその解析は単細胞系において行われ, 実際の細胞性粘菌アメーバを用いた生物学的な実験事実が多細胞系において行われているという, 異なる条件下で比較しているものであった.

一方, Nagano は, 細胞内の分子ネットワーク, 走化性運動及び細胞間相互作用に関する定式化を行い, 細胞動力学的なスキームを確立した(図 1.3.11) (Nagano, 1998) .

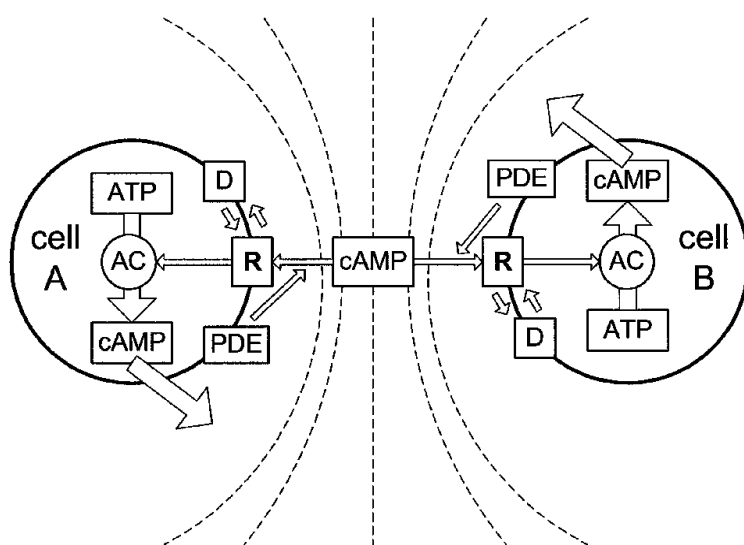


図 1.3.11 Nagano による細胞動力学スキーム(Nagano, 1998 より引用). 細胞内の分子ネットワークモデルは, Martiel and Goldbeter のモデル ( 図 1.3.4) (Martiel and Goldbeter, 1987) を用いて, 走化性運動を定式化, 細胞間相互作用を定式化したスキーム. ここで, R : 活性化状態の cAMP 受容体, D : 脱感作状態の cAMP 受容体, AC : アデニル酸シクラーゼ, ATP : アデノシン三リン酸を示す.

Nagano の確立した細胞動力学スキーム(図 1.3.11) では, 凝集機構の基本原理解明したものの, 細胞内の分子ネットワークは, 図 1.3.4 の Martiel and Goldbeter のモデルを用いていた. Nagano が用いた Martiel and Goldbeter のモデルは, cAMP が活性化状態の cAMP 受容体(R)へ結合し, 活性化された cAMP 受容体(R)がアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化する. 活性化されたアデニル酸シクラーゼは細胞内にある ATP から細胞

内 cAMP を合成し, その一部が細胞外へ分泌され細胞外 cAMP となるモデルであった.

図 1.3.4 に示すとおり, Martiel and Goldbeter のモデルは近年の細胞性粘菌の生物学的な実験事実を反映しておらず, このモデルを変更し, 細胞動力学理論へと導入し, 生物学的な実験事実と比較検証を行うことが必要であると考えられる. さらに, 細胞動力学理論と生物学的な実験事実との比較検証によって, 多細胞体形成の機構に関する妥当で適切な結論を得ることが可能になる.

ところで, 細胞内の分子ネットワークに関して, Sawai らは, cAMP 振動は PKA を介したフィードバックループによって生じるのではなく, PDE の効果によって cAMP が分解されるという細胞外のフィードバックループによって生じるのではないかと, という批判があった(Sawai *et al.*, 2005).

また, Gregor らは, RegA 遺伝子に変異を導入した細胞を孤立系に配置して, この細胞に飽和量の cAMP を与えるという条件において細胞性粘菌の振動が見られたことから, 単細胞系における振動は, RegA を介したフィードバックループを必要としないのではないかと, という批判もあった(Gregor *et al.*, 2010).

このため, 細胞性粘菌アメーバへ細胞動力学理論を用いることにより, 細胞内分子ネットワークが多細胞体形成機構へ与える影響について明らかにする必要がある.

## 第4節 本研究の目的

本研究は, Maeda らによって改良されたモデル(図 1.3.9)を基本として, 近年の生物学的な実験事実を取り入れることで, cAMP<sub>e</sub> と cAMP<sub>i</sub> のピーク振動順に関する問題, すなわち細胞内の分子生成に関する問題を解決できるモデルを構築し, そのモデルを用いた解析結果と近年の生物学的な実験事実とを比較し, モデルの妥当性を検証する. 次に, 細胞動力学理論を適用し, 多細胞系として扱えるようにする. そして近年の生物学的な実験事実と再度比較し, その妥当性を検証し, 細胞間調整機構が細胞凝集へ与える影響について明らかにすることを目的とする.



- (2) 定性的な適応の効果：cAR1 の構造変化が生じ、この cAR1 の構造変化が GDP と GTP との交換をもたらす．これによりヘテロ 3 量体 G タンパク質である  $G_{\alpha\beta\gamma}$  ユニットは、 $G_\alpha$  サブユニットと  $G_{\beta\gamma}$  サブユニットへの解離が促進され、 $G_\alpha$  サブユニットが ACA を活性化する．一方で、粘菌細胞へ一定した cAMP 刺激を与えると、細胞内 cAMP は適応することが示されている (Devreotes, 1983; Theibert and Devreotes, 1983)．しかし cAR1 受容体は適応しないことから (Kessin, 2001), cAR1 受容体の下流から ACA の間において適応しているものと考えられる．

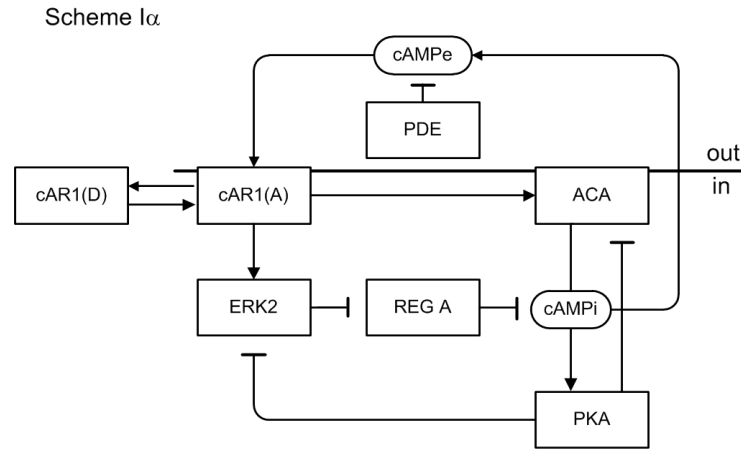


図 2.1.2 Scheme 1a. 細胞内分子ネットワークに適応と受容体のリン酸化を導入したモデル．(cAR1(A) ; 活性化状態の cAR1 受容体, cAR1(D) ; 不活性化状態の cAR1 受容体)

これら Scheme I 及び Scheme 1a を基に定式化される方程式を以下(2.1.1)に示す．

$$\begin{aligned}
 \frac{d[ACA]}{dt} &= k_1[cAR1] - k_2[ACA][PKA] \\
 \frac{d[PKA]}{dt} &= k_3[cAMPi] - k_4[PKA] \\
 \frac{d[ERK2]}{dt} &= k_5[cAR1] - k_6[PKA][ERK2] \\
 \frac{d[RegA]}{dt} &= k_7 - k_8[ERK2][RegA] \\
 \frac{d[cAMPi]}{dt} &= k_9[ACA] - k_{10}[RegA][cAMPi] \\
 \frac{d[cAMPe]}{dt} &= k_{11}[cAMPi] - k_{12}[cAMPe] \\
 \frac{d[cAR1]}{dt} &= k_{13}R_\alpha([cAMPe]) - k_{14}[cAR1]
 \end{aligned} \tag{2.1.1}$$

ここで、括弧[]はモル濃度を示し、[cAR1]は活性化状態である cAR1(A)のモル濃度を示す。このとき、生成量に対して阻害を与える効果を持つものは、その生成量を乗じることによって、その減衰効果を組み込んだ。つまり、 $d[ACA]/dt$ 、 $d[ERK2]/dt$ 、 $d[RegA]/dt$ 、 $d[cAMPi]/dt$ に関する方程式の減衰率は、[ACA]、[ERK2]、[RegA]、[cAMPi]に対して、それぞれ  $k_2[PKA]$ 、 $k_6[PKA]$ 、 $k_8[ERK2]$ 、 $k_{10}[RegA]$  を乗じたものとした。

また、受容体の適応を定性的に表す関数として  $R_a(x)$  を導入し、以下(2.1.2)のように定義した。

$$R_a(x) = \frac{x}{1 + (x/x_c)^\alpha} \quad (2.1.2)$$

$x=[cAMPe]$  を示す。ここで、受容体の適応を定性的に表す関数である  $R_a(x)$  は、リガンドである cAMPe が受容体へと結合することで構造が変化し、G タンパク質を活性化し、その後すぐに G タンパク質は不活性化し定常状態へ戻るという性質を定性的に現すものとして導入した。

受容体の適応を表す関数である  $R_a(x)$  の様々な  $\alpha$  についての計算例を図 2.1.3 に示す。

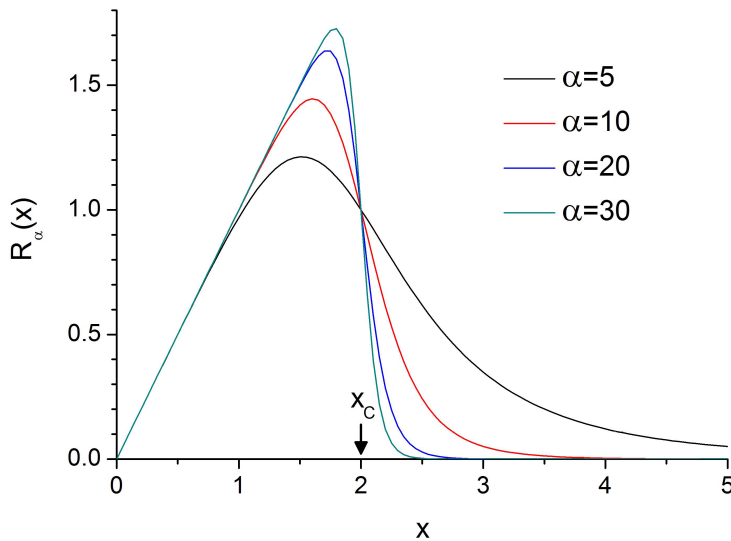


図 2.1.3 受容体の適応を表す関数である  $R_a(x)$  の計算例. この計算例では、 $x_c=2.0$  とした。受容体の活性は  $x > x_c$  となると、急に減少する。この関数は受容体の活性を模倣した典型的な例を示している。

$x([cAMPe])$  が 0 から増加するに従って  $R_a(x)$  は 0 から増加を始め、 $x$  が  $x_c$  に到達すると一転して増加から減少に転じ、0 へと漸近する。

Scheme I は適応の機構を持たず、 $\alpha=0$  の場合に対応する。Scheme I と Scheme Ia の  $k_{11}$  は、cAMPi が細胞外へと分泌するパラメータであり、その係数は  $0 \leq k_{11} \leq 1$  を満たすべきであると仮定した。

## 第2節 数値実験によるモデルの検証

第2章第1節で定式化した Scheme I 及び Scheme Ia について, 系統的に様々なパラメータの組み合わせを検討して, 約 7 分周期を持つ cAMP 振動を再現することに成功した. cAMP 振動を再現するパラメータを表 2.2.1 に示す. 表 2.2.1 に示すパラメータを用いた Scheme I の時間発展を図 2.2.1 に示し, Scheme Ia の時間発展を図 2.2.2 に示す.

図 2.2.1 のとおり, Scheme I について約 7 分周期を持つ cAMP 振動を再現したものの, 適応の効果が無いときの cAMP<sub>e</sub> ピークは cAMP<sub>i</sub> ピークよりも先に立ち上がることはなかった. しかし, cAMP<sub>e</sub> ピークの後に, cAR1 ピークが立ち上がり, これだけは生物学的な実験事実と合致した.

Scheme I のパラメータを表 2.2.1 に示す数値から変化させたが, cAMP<sub>e</sub>, cAMP<sub>i</sub>, cAR1 のピークの立ち上がり順が変わることはなかった. このピークの立ち上がり順に関する問題は, 図 2.2.2 に示すとおり, 適応を導入した Scheme Ia にて解決可能であった.

図 2.2.2 では, 受容体の適応を表す関数中の  $\alpha$  の値を  $\alpha=20$  とした.  $\alpha$  の値を 20 から 11 にし, 適応を約 55%程度に弱めたところ, 振動周期は長くなるものの振動が停止することは無く(図 2.2.3),  $\alpha=11$  の条件では細胞性粘菌の発生は通常通り完了するものと考えられた. しかし,  $\alpha=10$  とすると振動は停止し(図 2.2.4),  $\alpha=10$  の条件では細胞性粘菌の発生が途中で停止し, 完了しないものと考えられた.

一方, これまでに Kim らによって, cAR1 受容体のリン酸化を約 55%程度弱めた変異体である T289 を用いた研究がなされている. この Kim らの研究では, 細胞性粘菌の T289 細胞であっても, 発生自体に異常は見られず, また, ACA 活性についても Wild Type と大きく変わらないことが示されている(Kim *et al.*, 1997) .

これより, 適応を 55%程度弱めた数値計算の結果と, Kim ら(Kim *et al.*, 1997) との結果とが定性的に一致しており, cAR1 のリン酸化は走化性や遺伝子発現にそれほど重要ではないことを確認した.

表 2.2.1 Scheme I 及び Scheme Ia パラメータ値.

Parameter	Units	Scheme I	Scheme Ia
$k_1$	$\text{min}^{-1}$	19.7	2.3
$k_2$	$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	2.6	0.3
$k_3$	$\text{min}^{-1}$	0.4	0.6
$k_4$	$\text{min}^{-1}$	1.0	0.6
$k_5$	$\text{min}^{-1}$	5.1	0.6
$k_6$	$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	9.4	1.1
$k_7$	$\text{M} \text{min}^{-1}$	2.6	0.3
$k_8$	$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	24.9	2.9
$k_9$	$\text{min}^{-1}$	34.0	0.4
$k_{10}$	$\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$	9.4	1.1
$k_{11}$	$\text{min}^{-1}$	0.8	0.7
$k_{12}$	$\text{min}^{-1}$	19.7	2.3
$k_{13}$	$\text{min}^{-1}$	19.7	2.3
$k_{14}$	$\text{min}^{-1}$	6.0	0.7
$x_c$	M	2.0	2.0
$\alpha$	-	0	20

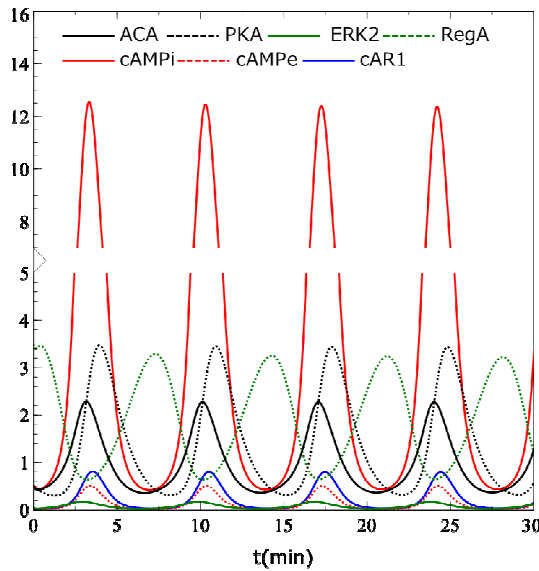


図 2.2.1 Scheme I の時間発展.

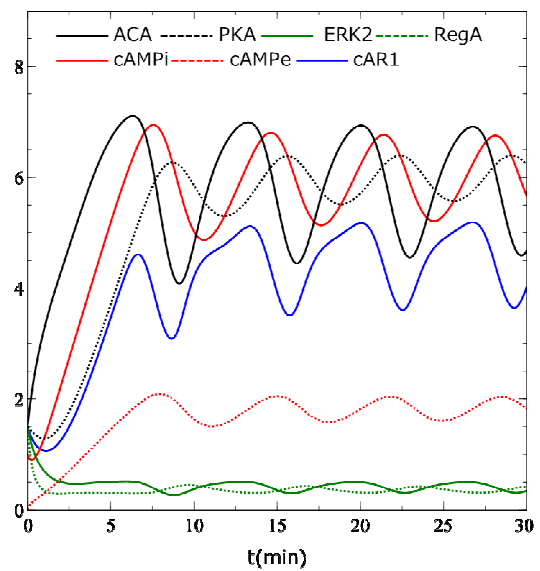


図 2.2.2 Scheme Ia の時間発展. ( $\alpha=20$ )

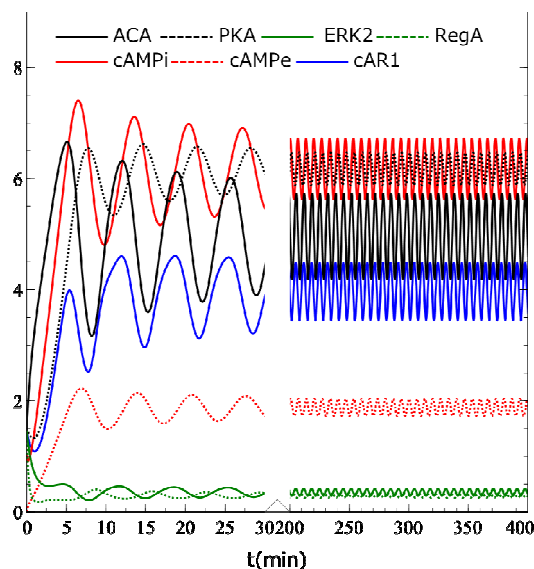


図 2.2.3 Scheme Ia の時間発展. ( $\alpha=11$ )

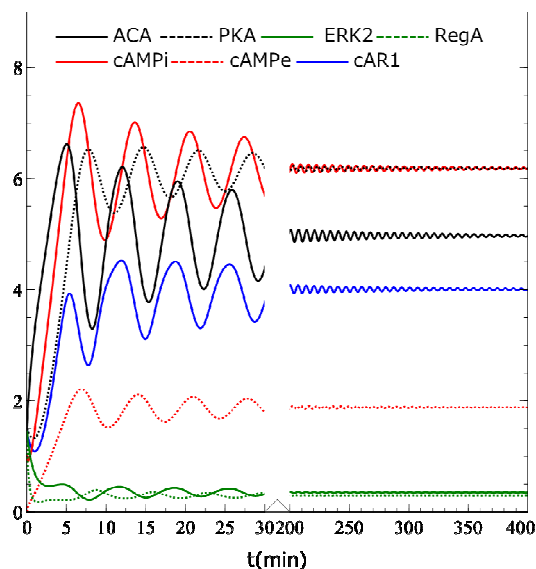


図 2.2.4 Scheme Ia の時間発展. ( $\alpha=10$ )

### 第3節 提案モデルの G タンパク質のキネティクス

第 2 章第 2 節までにおいて、細胞性粘菌における細胞内分子ネットワークのモデリングを行い、定性的ではあるが、適応とリン酸化に関する効果を導入し、cAMPe と cAMPi のピークの発生順に関する問題を解決してきた。

しかし、細胞性粘菌における、cAMP 受容体は GPCR(G-Protein Coupled Receptor : G タンパク質共役型受容体)であり、 $R_{\alpha}(x)$ の実体を明らかにする必要がある。そこで、cAMPe が cAMP 受容体である cAR1 へ結合することで、cAR1 の構造変化が生じ、この cAR1 の構造変化が GDP と GTP との交換をもたらす。これによりヘテロ 3 量体 G タンパク質である  $G_{\alpha\beta\gamma}$  ユニットは、 $G_{\alpha}$  サブユニットと  $G_{\beta\gamma}$  サブユニットへの解離が促進され、 $G_{\alpha}$  サブユニットが ACA を活性化する。活性化された ACA は cAMPi を生成し、リガンドが結合している cAR1 は ERK2 を活性化する。cAMPi は cAMP 依存性タンパクキナーゼ A(PKA)を活性化させ、PKA は mitogen-activated protein(MAP) kinase である ERK2 を阻害する。また、PKA は ACA の活性をも阻害すると仮定する。

一方、RegA は cAMPi を分解し、分解されない cAMPi の一部は細胞外へと分泌されることで cAMPe となる。cAMPe は cAR1 と結合するかもしれない、細胞外ホスホジエステラーゼである PDE に分解され、分子ネットワークを一回りする。



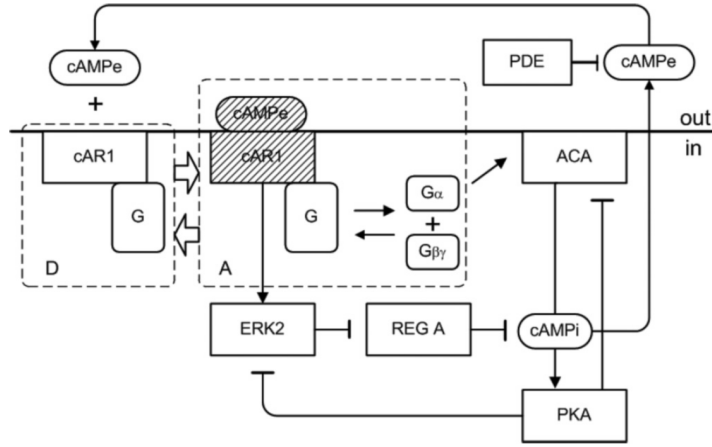
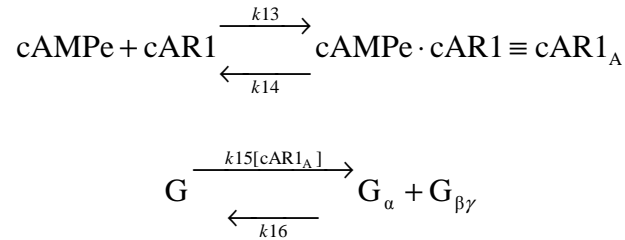


図 2.3.1 cAMP 振動と適応の分子ネットワーク. cAMPe は cAR1 へと結合して, G タンパク質を  $G_\alpha$  サブユニットと  $G_{\beta\gamma}$  サブユニットへと解離を促進させる.  $G_\alpha$  サブユニットは ACA を経由して cAMPi 生成を促進する. 一旦細胞内の  $G_\alpha$  濃度が十分に上昇すると cAMP 生成は停止し, 適応と受容体の脱感作を導く.

図 2.3.1 に示す受容体のキネティクスと G タンパク質のキネティクスはそれぞれ以下のように定式化することができる.



ここで,  $G$  は不活性な G タンパク質を示し,  $\text{cAR1}_A$  はリガンドが結合した活性化状態の cAR1 受容体を示す. また解離定数は,  $K_d = k_{14} / k_{13}$  によって定義され, cAR1 と G タンパク質に関する保存則はそれぞれ以下のとおりとなる.

$$[\text{cAR1}] + [\text{cAR1}_A] = \text{cAR1}_0 = G_0$$

$$[G] + [G_\alpha] = G_0$$

ここで  $G_0$  及び  $\text{cAR1}_0$  は, それぞれ G タンパク質及び cAR1 の全濃度を示す. G タンパク質のすべての数と, 受容体のすべての数は等しいものと仮定すると共に,

$[G_\alpha] = [G_{\beta\gamma}]$  の関係が維持されるものと仮定する.

そして, 図 2.3.1 に示すモデルを定式化すると以下(2.3.1)式の通りとなる.

$$\begin{aligned}
\frac{d[ACA]}{dt} &= k_1[G_\alpha] - k_2[PKA][ACA] \\
\frac{d[PKA]}{dt} &= k_3[cAMPI] - k_4[PKA] \\
\frac{d[ERK2]}{dt} &= k_5[cAR1_A] - k_6[PKA][ERK2] \\
\frac{d[RegA]}{dt} &= k_7 - k_8[ERK2][RegA] \\
\frac{d[cAMPI]}{dt} &= k_9[ACA] - k_{10}[RegA][cAMPI] \\
\frac{d[cAMPe]}{dt} &= k_{11}[cAMPI] - k_{12}[cAMPe] \\
\frac{d[cAR1_A]}{dt} &= k_{13}(G_0 - [cAR1_A])[cAMPe] - k_{14}[cAR1_A] \\
\frac{d[G_\alpha]}{dt} &= k_{15}[cAR1_A](G_0 - [G_\alpha]) - k_{16}[G_\alpha]^2
\end{aligned} \tag{2.3.1}$$

ここで、括弧[]はモル濃度を示す。  $d[cAR1_A]/dt$  及び  $d[G_\alpha]/dt$  に関する方程式において、リガンドが結合していない cAR1 のみが cAMPe と結合でき、ヘテロ 3 量体として存在している G タンパク質のみが解離できると仮定する。

$d[G_\alpha]/dt$  に関する方程式において、  $[G_\alpha] = [G_{\beta\gamma}]$  の関係を用いた。

阻害に関する作用は Scheme I 及び Scheme Ia の場合と同様に、減衰率を増幅させるように仮定しており、  $[ACA]$ 、  $[ERK2]$ 、  $[RegA]$  及び  $[cAMPI]$  のそれぞれの減衰率は、  $k_2[PKA]$ 、  $k_6[PKA]$ 、  $k_8[ERK2]$  及び  $k_{10}[RegA]$  を乗じるものとした。  $G_0$  に関しては、  $1\mu M \leq G_0 \leq 139\mu M$  を仮定した。

ここで、G タンパク質と受容体の分布が細胞表面のみである場合、つまり、G タンパク質と受容体とが脂質二重層中のみに均一に分布していると仮定すると、細胞性粘菌 1 細胞当りの cAR1 受容体の数を  $2.63 \times 10^5$  (Johnson *et al.*, 1992) , アボガドロ数を  $6.02 \times 10^{23}$  , 細胞性粘菌の細胞の半径を  $5 \times 10^{-6}m$  , 脂質二重層の厚さ  $10 \times 10^{-9}m$  (Alberts *et al.*, 2002) とすると、

$$\begin{aligned}
G_0 &= \frac{2.63 \times 10^5}{6.02 \times 10^{23} \times (4 \times \pi \times (5 \times 10^{-6})^2) \times (10 \times 10^{-9}) \times 10^3} M \\
&\approx 139\mu M
\end{aligned}$$

$G_0$  は最大値(139 $\mu M$ )となる。

一方、G タンパク質と受容体の分布が 1 細胞の全体積中に均一に分布していると仮定すると、

$$\begin{aligned}
G_{0\min} &= \frac{2.63 \times 10^5}{6.02 \times 10^{23} \times \frac{4}{3} \pi (5 \times 10^{-6})^3 \times 10^3} \text{M} \\
&\approx \frac{3 \times 10^5}{6 \times 10^{23} \times \frac{4}{3} \pi (5 \times 10^{-6})^3 \times 10^3} \text{M} \\
&\approx 1 \mu\text{M}
\end{aligned}$$

$G_0$ は最小値(1 $\mu\text{M}$ )となる．これより  $G_0$  の真値は,  $1 \mu\text{M} \leq G_0 \leq 139 \mu\text{M}$  の範囲内であることが期待され, パラメータにはこの範囲となるような値を採用した．

系統的にパラメータを変化させて, cAMP 振動が細胞性粘菌の生物学的な実験事実と合致する振動周期約 7 分となる速度定数の組み合わせを表 2.3.1 に示す．また, 時間発展を図 2.3.2 に示す．

Janetopoulos らは, cAMP 受容体が cAMP によって刺激されている間,  $G_a$  は減少しないことを観測した (2.3.1 の最後の式がこれに対応)．細胞外から cAMP の一定供給がなければ, PDE による cAMP の分解や, cAMP 自体の拡散によって細胞外 cAMP 濃度は減少し (Janetopoulos *et al.*, 2001) , 図 2.3.2 に示す時間発展の結果は, Janetopoulos らが測定した FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)測定結果とも一致している．また, 細胞内 cAMP と細胞外 cAMP が同時に振動しており, Gerisch らの結果 (Gerisch and Wick, 1975) と一致している．

これより, G タンパク質のキネティクスを導入した本モデルの妥当性を確認したことになる．しかし, 本モデルは細胞内と細胞外だけを扱っており単一細胞モデルとしてはまだ不完全であり, cAMP の拡散効果も含まれていない．しかも cAMP 自励振動の発生のためには細胞内から細胞外への分泌係数である  $k_{11}$  の値を実験値である  $k_{11} = 3.6 \text{ min}^{-1}$  (Gregor *et al.*, 2010)から大きく変更することも必要であった．

表 2.3.1 図 2.3.1 に示すモデルの速度定数.

Parameter	Units	Nominal Value
$k_1$	$\text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_2$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	7.6
$k_3$	$\text{min}^{-1}$	$7.3 \times 10^{-1}$
$k_4$	$\text{min}^{-1}$	$4.8 \times 10^{-1}$
$k_5$	$\text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_6$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	5.4
$k_7$	$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$	4.8
$k_8$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_9$	$\text{min}^{-1}$	5.2
$k_{10}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$1.6 \times 10$
$k_{11}$	$\text{min}^{-1}$	$8.5 \times 10^{-1}$
$k_{12}$	$\text{min}^{-1}$	$1.0 \times 10$
$k_{13}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	6.9
$k_{14}$	$\text{min}^{-1}$	$1.2 \times 10$
$k_{15}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	3.5
$k_{16}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	3.0
$G_0$	$\mu\text{M}$	4.0

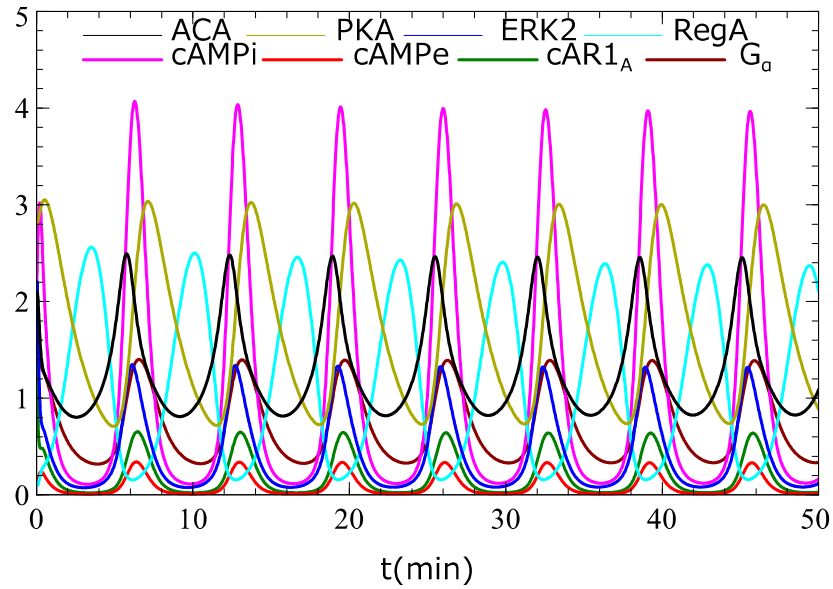


図 2.3.2 図 2.3.1 に示す分子ネットワークの時間発展.

## 第3章 細胞性粘菌の動力学的解析

実験的には、単一の細胞性粘菌は cAMP 振動を発生せず、細胞集団が自発的な cAMP 振動を発生するということが知られている。一方、第 2 章で述べたモデルは細胞内外の区別があるものの、数理的には、「単細胞系における細胞内での分子ネットワーク」である。このため cAMP の細胞外への分泌率の実験値である  $k_{11}=3.6\text{min}^{-1}$  (Gregor *et al.*, 2010) の代わりに、Scheme I では  $k_{11}=0.8\text{min}^{-1}$ 、Scheme Ia では  $k_{11}=0.7\text{min}^{-1}$ 、G タンパク質キネティクスを導入したモデルでは  $k_{11}=8.5\times 10^{-1}\text{min}^{-1}$  を採用し、単一細胞でも cAMP 振動を発生させている。

1998 年、細胞性粘菌における非常に効率的な凝集行動を説明するために、拡散効果を介した同期化法が Nagano のよって提案された (Nagano, 1998)。この同期化法に関する一連の研究によって、細胞内代謝系の交互同期と細胞性粘菌アメーバの頑強な凝集行動についての本質はリガンドの拡散と受容体との共役であることが明らかとなった (Nagano, 2000a, 2000b, 2003)。

Nagano による細胞動力学理論 (Nagano, 1998) は、細胞内における反応系に関する方程式、走化性に関する方程式及び細胞間相互作用に関する方程式の 3 つを組み合わせたスキームであった。細胞内における反応系は、アデノシン三リン酸 (ATP) から cAMP を合成し、その一部を細胞外へと分泌する Martiel and Goldbeter のモデル (図 1.3.4) (Martiel and Goldbeter, 1987) を用いており、必ずしも近年の生物学的な実験事実を反映したモデルではなかった。

そこで、ここでは Martiel and Goldbeter のモデルの代わりに、第 2 章第 3 節で示した分子ネットワークを用いる。ただし、cAMP の細胞外への分泌率については実験値である  $k_{11}=3.6\text{min}^{-1}$  (Gregor *et al.*, 2010) を採用する。さらに、cAMPe に関する方程式については、細胞の空間的な分布と cAMP の拡散に関する効果を考慮する。

### 第1節 新しい細胞動力学モデル

次の(1)から(4)により、細胞動力学モデルを定式化する。

(1) 細胞内分子キネティクス

(2.3.1)で与えられた細胞内の分子キネティクスを以下(3.1.1)のように置き換える。

$$\begin{aligned}
\frac{d[\text{ACA}]_j}{dt} &= k_1[\text{G}_\alpha]_j - k_2[\text{PKA}]_j[\text{ACA}]_j \\
\frac{d[\text{PKA}]_j}{dt} &= k_3[\text{cAMPe}]_j - k_4[\text{PKA}]_j \\
\frac{d[\text{ERK2}]_j}{dt} &= k_5[\text{cAR1}_A]_j - k_6[\text{PKA}]_j[\text{ERK2}]_j \\
\frac{d[\text{RegA}]_j}{dt} &= k_7 - k_8[\text{ERK2}]_j[\text{RegA}]_j \\
\frac{d[\text{cAMPe}]_j}{dt} &= k_9[\text{ACA}]_j - k_{10}[\text{RegA}]_j[\text{cAMPe}]_j \\
\frac{d[\text{cAR1}^A]_j}{dt} &= k_{13}(G_{0,j} - [\text{cAR1}^A]_j)[\text{cAMPe}]_j - k_{14}[\text{cAR1}_A]_j \\
\frac{d[\text{G}_\alpha]_j}{dt} &= k_{15}[\text{cAR1}_A]_j(G_{0,j} - [\text{G}_\alpha]_j) - k_{16}[\text{G}_\alpha]_j^2
\end{aligned} \tag{3.1.1}$$

ここで、 $j$  は細胞の番号を示す.

## (2) cAMP の拡散

cAMPe に関する方程式は、細胞性粘菌アメーバの空間的な分布と cAMP の拡散を考慮して、以下(3.1.2)の通り定式化する.

$$\frac{\partial [\text{cAMPe}(\vec{x}, t)]_j}{\partial t} = k_{11} \sum_{j=1}^N [\text{cAMPe}(\vec{x}, t)]_j \delta(\vec{x} - \vec{x}_j) - k_{12} [\text{cAMPe}(\vec{x}, t)]_j + D \nabla^2 [\text{cAMPe}(\vec{x}, t)]_j \tag{3.1.2}$$

ここで、 $\delta(\vec{x})$  は 2 次元のデルタ関数、 $\vec{x}_j$  は細胞性粘菌アメーバの位置ベクトル、 $N$  は細胞性粘菌アメーバの数、 $D$  は cAMP の拡散係数を示し、その値は  $D = 0.024 \text{ mm}^2 / \text{min}$  を用いる (Dworkin and Keller, 1977) .

## (3) 走化性と細胞運動

細胞性粘菌アメーバに対する走化性運動の方程式を以下(3.1.3)のように定式化する.

$$m_a \frac{d^2 \vec{x}_j}{dt^2} = \varepsilon_2 \nabla_j [\text{cAMPe}(\vec{x}_j, t)] - \sum_{l=1(l \neq j)}^N \nabla_j \phi_{m,n}(|\vec{x}_j - \vec{x}_l|) - \eta \frac{d \vec{x}_j}{dt} \tag{3.1.3}$$

ここで、 $m_a$  は細胞性粘菌アメーバの質量、 $\varepsilon_2 \nabla_j [\text{cAMPe}(\vec{x}_j, t)]$  は走化性に関する力、

$\sum_{l=1(l \neq j)}^N \nabla_j \phi_{m,n}(|\vec{x}_j - \vec{x}_l|)$  は細胞間相互作用に関する力、 $\eta \frac{d \vec{x}_j}{dt}$  は平面上の摩擦力に関する

る力を表し， $\eta$ は摩擦係数を表す．

#### (4) 細胞間相互作用

細胞性粘菌アメーバは，凝集の際，細胞表面で接着性のタンパク質を合成し，細胞同士が接着可能な状態となる(Brar and Siu, 1993; Knecht *et al.*, 1987; Wong and Siu, 1986; Beug *et al.*, 1970; Beug *et al.*, 1973; Muller and Gerisch, 1978; Muller *et al.*, 1979) ．

この接着に関する細胞間相互作用について，Lennard-Jones potential を参考に(3.1.4)のとおり定式化する．

$$\phi_{m,n} = \varepsilon_1 \frac{mn}{m-n} \left[ \frac{1}{m} \left( \frac{\sigma_0}{r} \right)^m - \frac{1}{n} \left( \frac{\sigma_0}{r} \right)^n \right] \quad (3.1.4)$$

ここで， $\varepsilon_1$ はポテンシャルエネルギーの最小値で細胞間の接着力の強さを示し， $m$ は細胞間相互作用の斥力に関するパラメータ， $n$ は細胞間相互作用の引力に関するパラメータ， $\sigma_0$ は細胞性粘菌アメーバの直径， $r$ は細胞間距離を示す．

## 第2節 数値実験の結果

図 3.2.1 にシミュレーションの一例として，細胞性粘菌の **Wild Type** 細胞(細胞数 : 127 細胞)での凝集運動の典型例を示す．ここでは cAMP が細胞内から細胞外への分泌率を示す係数である  $k_{11}$  の数値には， $k_{11} = 3.6 \text{ min}^{-1}$  を用いた(Gregor *et al.*, 2010)．

このとき，細胞動力学における数値計算には，表 3.2.1 の値を用いた(Nagano, 1998; Dworkin and Keller, 1977) ．

表 3.2.1 細胞動力学に用いたパラメータ．

Parameter	Units	Nominal Value
$D$	$\text{mm}^2/\text{min}$	0.024
$\varepsilon_1$	$\text{g} \cdot \text{mm}^2/\text{min}^2$	$1.0 \times 10^{-13}$
$\varepsilon_2$	$\text{g} \cdot \text{mm}^2/\text{min}^2 \cdot \mu\text{M}$	$1.0 \times 10^{-11}$
$m_a$	g	$1.0 \times 10^{-9}$
$\eta$	-	$2.0 \times 10^{-1}$
$m$	-	9
$n$	-	3
$\sigma_0$	mm	$1.0 \times 10^{-2}$

表 3.2.1 細胞動力学に用いたパラメータ(続き).

Parameter	Units	Nominal Value
$k_1$	$\text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_2$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	7.6
$k_3$	$\text{min}^{-1}$	$7.3 \times 10^{-1}$
$k_4$	$\text{min}^{-1}$	$4.8 \times 10^{-1}$
$k_5$	$\text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_6$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	5.4
$k_7$	$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$	4.8
$k_8$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$2.3 \times 10$
$k_9$	$\text{min}^{-1}$	5.2
$k_{10}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	$1.6 \times 10$
$k_{11}$	$\text{min}^{-1}$	3.6
$k_{12}$	$\text{min}^{-1}$	$1.0 \times 10$
$k_{13}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	6.9
$k_{14}$	$\text{min}^{-1}$	$1.2 \times 10$
$k_{15}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	3.5
$k_{16}$	$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	3.0
$G_0$	$\mu\text{M}$	4.0



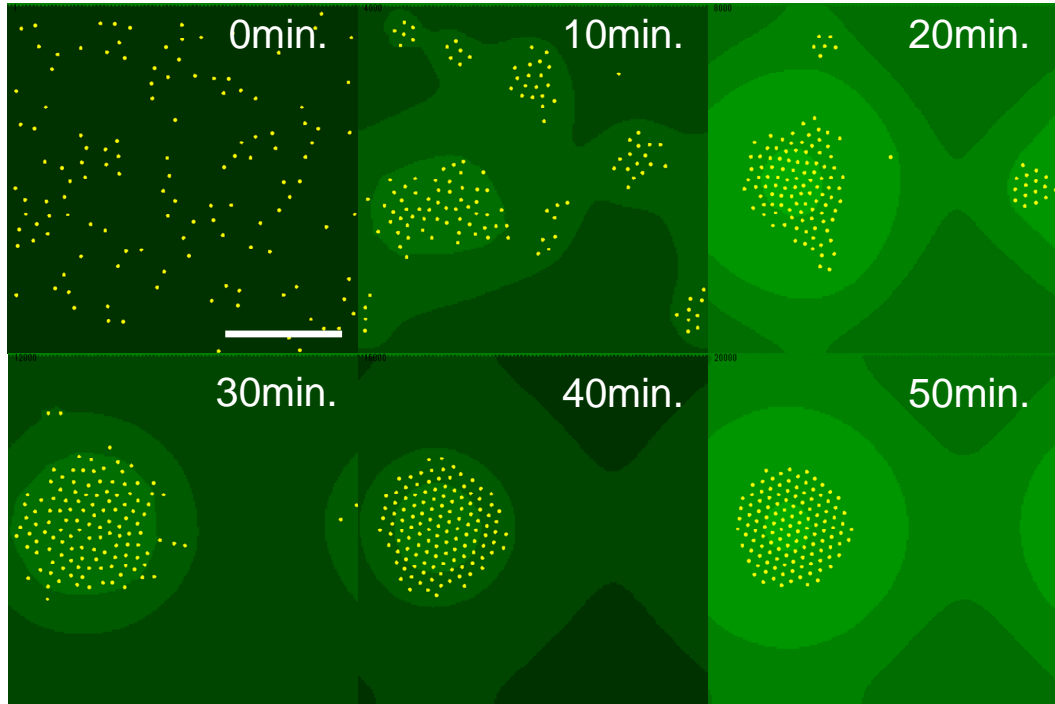


図 3.2.1 Wild Type 細胞(細胞数: 127 細胞)における時間発展. (エリアサイズ:  $30\sigma_0 \times 30\sigma_0$ , ここで  $\sigma_0$  は細胞性粘菌アメーバの直径を示す. 黄色の円は細胞性粘菌アメーバを示し, 等高線図における濃淡は細胞外 cAMP 濃度の高低を示している. Bar: 100 $\mu$ m)

自発的な cAMP 振動の始まりを明らかにするために, 細胞数をそれぞれ  $N = 7$ ,  $N = 37$ ,  $N = 61$  として 6 角形状に配置し, その中心細胞の cAMP<sub>i</sub> 振動と cAMP<sub>e</sub> 振動の時間発展を図 3.2.2 に示す. ここで, それぞれ隣同士の細胞間の距離は, 細胞の直径である  $\sigma_0$  とした.

$N = 7$  の時, 自発的な cAMP 振動は現れなかった. 自発的な cAMP 振動が現れたのは,  $N = 37$ ,  $N = 61$  のときであった. しかし,  $N = 37$  の振動は除々に減衰しており, 持続する安定な振動が得られたのは,  $N = 61$  のときのみであった.

これは, 持続する自発的な cAMP 振動が発生する際に, 閾値となる細胞数  $N_c$  が存在することを示している. また,  $k_{11}$  を減少させると  $N_c$  値が大きくなる傾向があった. つまりこれは,  $k_{11}$  が小さくなるとき, 自己の自発的な cAMP 振動を維持するためには, バイスタンダー細胞(第三者細胞)から cAMP がより多く拡散することが必要であるということを示している. 一方で, 細胞数や結合する cAMP の量が, ある閾値以上に多くなっても cAMP 振動は再び停止した.

この細胞数や細胞外の cAMP レベルによって, cAMP 振動が開始したり, 停止したりするのは, cAMP 振動の同期によって達成されている(Nagano, 1998). これはこれまでのシミュレーション研究において, たとえ初期状態がランダムであったとしても, 細

胞間の相互同期が早い段階で達成されることを示している.

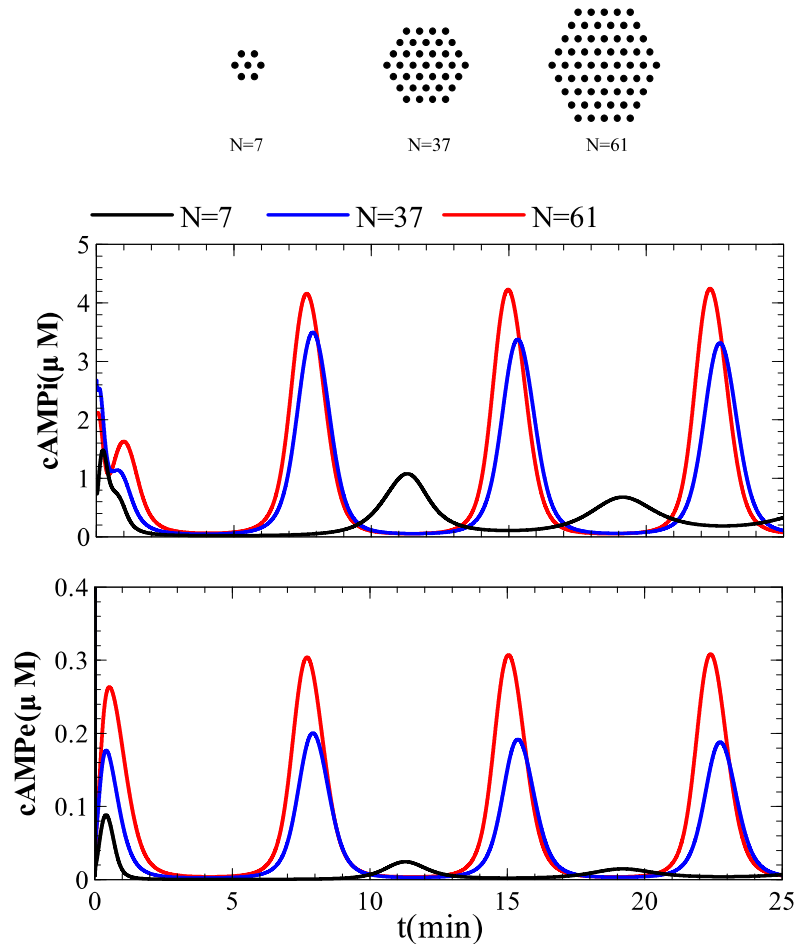


図 3.2.2 持続する自発的な cAMP 振動の閾値の存在を示す図. 細胞数  $N = 7$  として六角形状に配置した場合, 自発的な cAMP 振動は見られない. 細胞数  $N = 37$  として六角形状に配置した場合, パルス状の cAMP 振動が見られたが, 振動は徐々に減衰する. 六角形状に配置する細胞数を  $N = 61$  へと増加させると, 安定したパルス状の cAMP 振動が見られた. ここで, cAMP のリークレート  $k_{11}$  は  $k_{11} = 3.6 \text{ min}^{-1}$  を用いた (Gregor *et al.*, 2010).

### 第3節 生物学的実験事実と, 数値実験との比較検討

ここで, 第 3 章第 1 節で示した細胞動力学スキームについて, 凝集パターンの変化や cAMP パルスの変化を比較検証し, この細胞動力学スキームの妥当性と, 以下の批判について検討する.

Maeda らが提案した PKA や RegA の役割 (Maeda *et al.*, 2004) に対して, cAMP 振動は

PKA を介したフィードバックループによって生じるのではなく、PDE の効果によって cAMP が分解されるという細胞外のフィードバックループによって生じるのではないか、という Sawai らの批判(Sawai *et al.*, 2005)や、RegA 遺伝子に変異を導入した細胞を孤立系に配置して、この細胞に飽和量の cAMP を与えるという条件において細胞性粘菌の振動が見られたために、単細胞系における振動は、RegA を介したフィードバックループを必要としないのではないかと、Gregor らの批判がある(Gregor *et al.*, 2010).

このため、次の4つの変異体の場合についての検証を行った。

その4つの変異体とは、

- (a) RegA 変異体(RegA- : RegA の生成率を  $k_7 \rightarrow k_7 / 5$  と減少させたもの)
- (b) ERK2 変異体(ERK2- : ERK2 の生成率を  $k_5 \rightarrow k_5 / 5$  と減少させたもの)
- (c) PKA 変異体(1)(PKA-(1) : ネガティブフィードバックを  $k_2 \rightarrow k_2 / 5$ ,  $k_6 \rightarrow k_6 / 5$  と減少させたもの)
- (d) PKA 変異体(2)(PKA-(2) : PKA の生成率を  $k_3 \rightarrow k_3 / 5$  と減少させたもの)

である。

なお、変異体における検証では、表 3.2.1 の生成率パラメータやネガティブフィードバックに関するパラメータの数値を Nominal Value の 1/10~1/3 に変更して調べた。しかし、定性的な違いがなかったことから 1/5 の場合を代表例として図 3.3.2 に示す。なお図 3.3.1 の×マークが今回パラメータの数値を変更した箇所を示している。

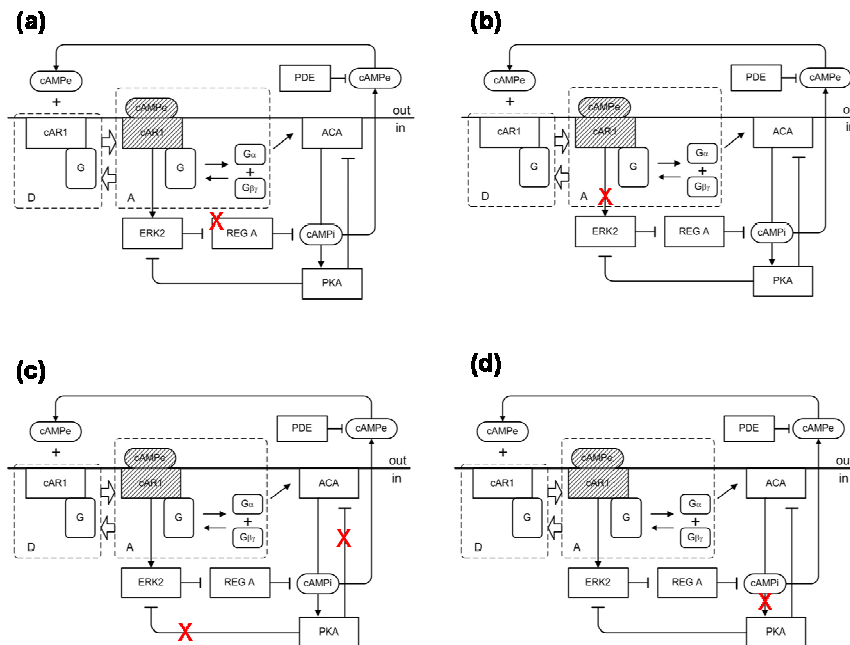


図 3.3.1 各変異体の細胞内分子ネットワーク。(a) RegA- : RegA 変異体, (b) ERK2- : ERK2 変異体, (c) PKA-(1) : PKA-変異体(1), (d) PKA-(2) : PKA-変異体(2)。

図 3.3.2 に、各変異体(細胞数 : 127 細胞)による凝集シミュレーションの画像を示す。ここで示す凝集シミュレーションの画像は初期状態から 10 分後のものを示す。

図 3.2.1 に示す通り、初期状態から 10 分後における Wild Type 細胞(127 細胞)での凝

集は，凝集完了から程遠い状態であった．しかし，**RegA** 変異体及び 2 つの **PKA** 変異体は，初期状態から 10 分後において凝集完了に近い状態であった．一方で，**ERK2** 変異体は，凝集から程遠い状態で，凝集パターンの初期であった．

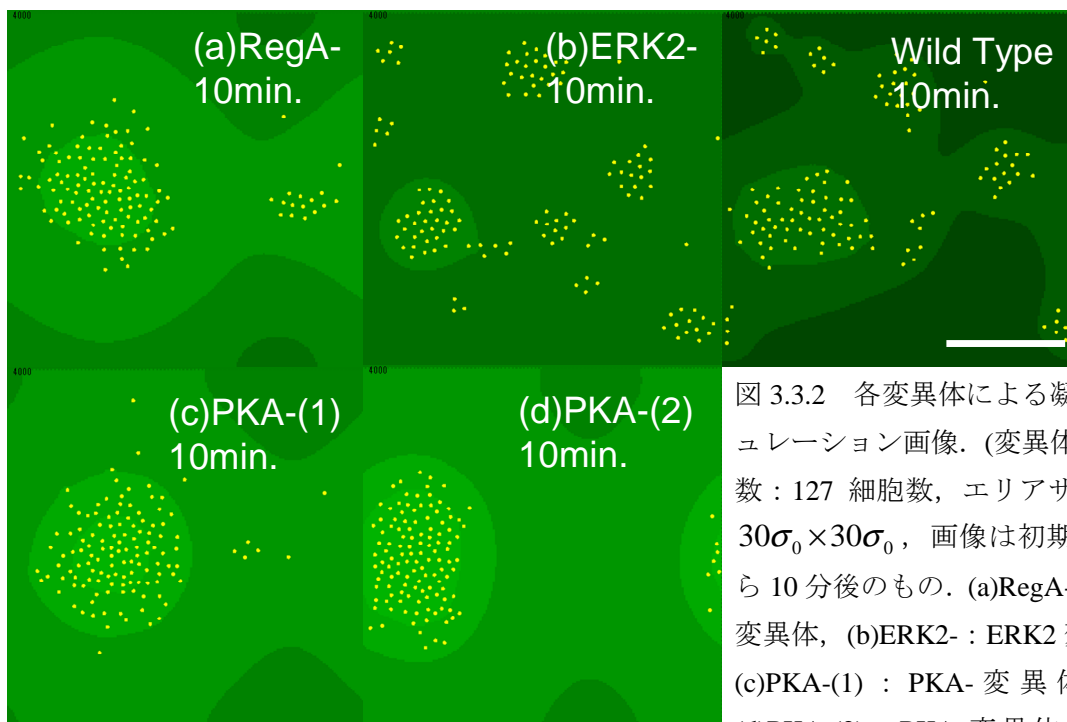


図 3.3.2 各変異体による凝集シミュレーション画像．(変異体の細胞数：127 細胞数，エリアサイズ： $30\sigma_0 \times 30\sigma_0$ ，画像は初期状態から 10 分後のもの．(a)RegA-：RegA 変異体，(b)ERK2-：ERK2 変異体，(c)PKA-(1)：PKA- 変異体 (1)，(d)PKA-(2)：PKA- 変異体 (2) Bar: 100 $\mu$ m).

これらの違いが生じる原因を明らかにするために，図 3.3.3 に空間に 1 細胞を配置した **cAMPe** の時間発展を示し，図 3.3.4 に 37 細胞を 6 角形状に配置した細胞集団の中心細胞の **cAMPe** の時間発展を示す．

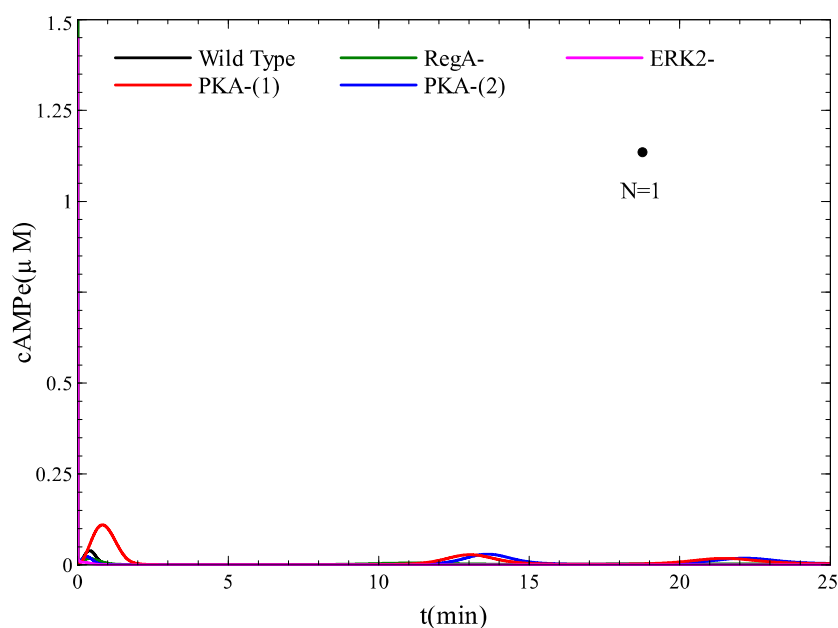


図 3.3.3 空間に配置した 1 細胞における cAMPe の時間発展. いずれの細胞種においても持続する安定な cAMP 振動を発生しないことが見られた.

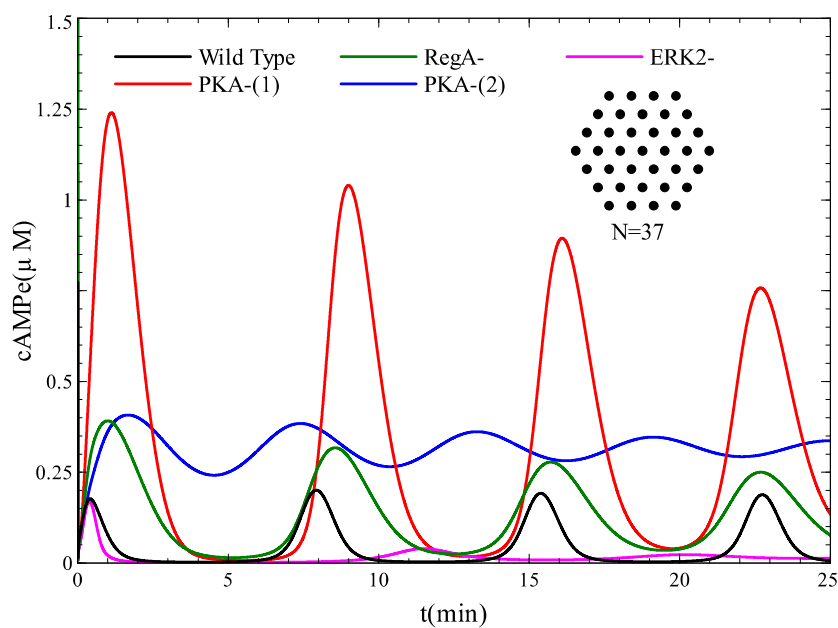


図 3.3.4 37 細胞における細胞集団での中心細胞の cAMPe の時間発展. RegA 変異体細胞と PKA 変異体細胞は, Wild Type 細胞と比較して振幅が大きな cAMP パルスを生成している. 一方で, ERK2 変異体細胞は Wild Type 細胞と比較して振幅が非常に小さな cAMP パルスであることが見られた.

孤立した 1 細胞状態では明らかな持続する振動は認められない(図 3.3.3)が, ここで扱ったすべての変異体の細胞集団では振動が実現した(図 3.3.4). つまり, cAR1 受容体を

介した細胞間調整は cAMP 振動を復活させることを意味している。さらに、Wild Type 細胞における細胞集団、RegA 変異体における細胞集団と、2 種の PKA 変異体における細胞集団とを比較すると、RegA 変異体と 2 種の PKA 変異体は cAMP 分泌を増大させている。このため、Wild Type 細胞よりも早く、RegA 変異体における細胞集団と、2 種の PKA 変異体における細胞集団においては凝集が始まっている。

一方で、ERK2 変異体における細胞集団は、振動する cAMP 分泌を著しく減少させている。

Wild Type 細胞(細胞数：127 細胞)による結果では、127 個の細胞の凝集が完了してもなお cAMP 生成の振動を維持しており、更に多くの細胞が凝集に参加することになる。しかし、RegA 変異体や 2 種の PKA 変異体では cAMP が過生成し、127 個の細胞の場合で既に cAMP 振動が止まっており、これ以上大きな凝集体へは発展しない。

一方 Sawai らは、RegA 変異体及び PKA 変異体の凝集体は、Wild Type 細胞での凝集と比較して、多数の凝集中心が形成されるために凝集領域が大きくなることを報告している(Sawai *et al.*, 2005)。したがって多細胞系における 4 つの変異体の計算結果は実験事実と一致しており、本細胞動力学スキームが妥当であることを示している。更に cAMP 受容体を介した細胞間調整機構が cAMP 自励振動のロバスト性を保障していることを示す。

## 第4章 結論

細胞性粘菌のシグナル伝達物質である cAMP は、まず細胞内で合成された後、一部が細胞外へと分泌、拡散することで細胞間コミュニケーションを行っている。しかし、Maeda らの細胞内分子ネットワークは cAMPe の振動のピークが現れた後に、cAMPi のピークが現れるといった矛盾があった。

この cAMPi と cAMPe の振動ピークの順番に関する問題を解決するために、第 2 章第 1 節及び第 2 章第 2 節にて、cAMP の分泌経路の変更を行い、Scheme I として検討したが、cAMPi と cAMPe の振動の順番に関する問題を解決することはできなかった。

そこで、cAMP 受容体へ適応の効果を定性的な関数である  $R_a$  関数で導入することで、cAMPi と cAMPe の振動の順番に関する問題を解決した。このため、振動の順番に関する問題を、完全に解決するためには、適応とリン酸化の効果を導入することが必要であると考えられた。

第 2 章第 3 節では、cAR1 受容体の適応を定性的な関数  $R_a$  の代わりに、G タンパク質のキネティクスを導入、定式化した。cAMPi と cAMPe の振動のピークの順番に関する問題が解決されており、適応の実体は G タンパク質であると考えられる。

第 3 章では、Nagano による研究(Nagano, 1998)の細胞内の反応に関するモデルを、第 2 章第 3 節で示した G タンパク質の適応を導入したモデルへと変更した細胞動力学スキームを構築した。シミュレーションの結果、興奮性を示さない細胞が興奮性を示して一時的な凝集中心を形成し、これが成長して大きな凝集中心を形成した。凝集中心にいる細胞数が増加すると cAMPi の周波数が変化していき、cAMPi は形態形成が始まるのに必要とする準定常状態へと近づいていった。

第 3 章の結果から、cAMP 振動は細胞集団から生じており、孤立した 1 細胞からは生じない、ということは明らかであった。つまり、個々の細胞内の分子ネットワークの反応は、cAMP 受容体を介して共役しており、この共役を通じて、cAMP 振動が始まるということを示している。注目すべき点は、多細胞系では、変異体であっても、cAMP を介した細胞間相互作用によってロバストな cAMP 振動が実現されたことである。

これは見方を変えれば、多細胞系では、細胞内分子ネットワークへ変異を導入したとしても、それに見合った表現型(phenotype)が見られるとは限らないことを示している。

このように、本研究では細胞内分子ネットワークの構築とその動力学的な解析によって、G タンパク質共役型受容体を介した細胞間調整機構が細胞凝集へ与える影響について明らかにした。

一方、G タンパク質の下流には、低分子 G タンパク質である RasG(Weeks and Spiegelman, 2003)や PIP3(Huang *et al.*, 2003)といったモジュールが存在していることが明らかとなっているが、本研究で構築した細胞内ネットワークはこれらのモジュールをまだ組み込んでいない。このため本研究で構築した細胞内ネットワークは、まだ改

良の余地が残されているといえる。

多細胞系での効果を定量的に扱うためには、小さな孤立した実験系の構築が不可欠であると考えられる。小さな孤立した実験系にて 1 細胞単位で細胞を固定化し、定量測定系が構築できれば、どれくらいの細胞数から多細胞系としての特徴が発現するかどうかを明らかにでき、生物の多細胞体構築の基本原理を解明できるものと期待される。この小さな孤立した系の構築に関する実験手法の開発は、Sakurai らが寒天培地上にマイクロウェルを作製することに成功し(Sakurai *et al.*, 2006)、この寒天培地上に作製したマイクロウェル構造を用いて Nagano が予想した計算機シミュレーション(Nagano, 2000a)を実験的に再現した(櫻井, 2007; 付録 B 参照)。また、上條と水谷は、この寒天培地上に作製したマイクロウェル実験系へ細胞性粘菌アメーバを固定化し、細胞内 cAMP 振動の可視化と定量化に向けた研究を行い、小さな孤立した系の構築は実現可能なものになりつつある状況である(上條, 2013; 水谷, 2013)。

従って本研究が発展すると、細胞性粘菌だけにとどまらず、生物に共通する多細胞体形成の基本原理が徐々に明らかになることが期待される。



## 謝辞

本研究を行うにあたり，立命館大学 長野正道教授には，博士号取得を目指してからの4年間という長期間にわたり，厳しくも温かなご指導をいただきました。また，学生であった頃から博士号取得までの間，家族ぐるみでの付き合いをさせていただくなど，公私を問わず大変お世話になりました。厚くお礼申し上げます。

第3章における計算はシステムバイオロジー研究室 森福弥さん，岡川和也さんに確認して頂きました。両氏のご協力に対して厚くお礼申し上げます。

付録Bでの細胞間コミュニケーション測定系に関するマイクロ微細構造の作製について，立命館大学 小西聡教授，マイクロ機械システム工学科小西研究室 平西亨さんにご協力いただきました。厚くお礼申し上げます。

立命館大学 高橋卓也教授，寺内一姫准教授に博士学位の審査をしていただきました。厚くお礼申し上げます。

最後に，2013年01月09日に生まれてからずっと私に笑顔を与えてくれ，励まし続けてくれた娘 咲綺と，社会人で博士号を取得することにしたために，休日や早朝，夜遅くに研究をする毎日となった私を献身的に支え，体調を気遣ってくれた妻 舞に深く感謝します。

## 付録 A 細胞内分子ネットワークのロバスト性

生物に見られる振動現象として、細胞性粘菌以外にサーカディアンリズムなどが広く知られている(例えば, Huang *et al.*, 2011). これら振動現象に関する研究には、非線形振動子であるリミットサイクル振動子を用いたモデルによって多くの研究がなされている(Winfree, 1980; Kawata and Suzuki, 1980) .

一般に生物は、運動の変化や環境の変化などで、その振動状態が乱されることがあるが、生物は恒常性を維持し、自身の振動性を維持している。

これは、生体に関するネットワークにおいてある一定の安定した振動を維持するためにパラメータ群を変化させることで、自身の恒常性を獲得しているものと考えられる。この恒常性を細胞内の分子ネットワークに置き換えると、より広いパラメータ領域での安定振動を実現できる能力を示している。

この広いパラメータ領域での安定振動を実現できる能力は、数学的には力学系における Hopf 分岐点を探すことに他ならない。Hopf 分岐点は、振動の発生しない平衡点からリミットサイクル振動が発生する分岐点のことであり、このリミットサイクル振動が発生できる領域が大きいことは生物が生存する上で、恒常性が高く、生存に有利になるものと考えられる。

リミットサイクル振動が発生できる領域が広いことをロバストネスが大きいとして、モデルのロバストネス分析を行った。

ここではMATCONT(Dhooge *et al.*, 2003)を用いて Maeda らが改良したモデル, Scheme I, Scheme Ia, Scheme Ia へ G タンパク質のキネティクスを導入したモデルの 4 つのモデルについてロバストネスを分析した。

これらの分析結果を表 A.1～A.4 に示す。  $k_j$ ,  $\bar{k}_j$  は、各パラメータ値を系統的に変更したとき、それぞれ安定なリミットサイクルが生じる下限値と上限値を示している。

Ma and Iglesias (Ma and Iglesias, 2002) は degree-of-robustness (*DOR*) 値を定義し、スキームのロバストネスを分析した。

$$DOR_j = 1 - \max\left(\frac{k_j}{\bar{k}_j}, \frac{\bar{k}_j}{k_j}\right) \quad (\text{A.1})$$

この定義では、 $k_j = \bar{k}_j$  もしくは、 $\bar{k}_j = k_j$  となるとき、これらの値は Hopf 分岐点となり、 $DOR_j = 0$  となる。  $DOR_j$  の値は 0～1 までの数値となり、 $DOR_j$  が 0 となるとき、スキームのロバストネスが小さくなり、 $DOR_j$  が 1 となるとき最もスキームのロバストネスが大きくなることを示している。

表 A.1 Maeda らが改良したモデルのロバストネス.

Parameter	Nominal Value	$\underline{kj}$	$\bar{kj}$	$DOR_j$
$k_1$	2.0	1.90	>200	0.05
$k_2$	0.9	0.71	1.60	0.21
$k_3$	2.5	0.00	2.78	0.10
$k_4$	1.5	0.00	1.59	0.06
$k_5$	0.6	0.54	>200	0.10
$k_6$	0.8	0.09	0.87	0.08
$k_7$	1.0	0.00	1.11	0.09
$k_8$	1.3	1.17	>200	0.09
$k_9$	0.3	0.00	0.33	0.10
$k_{10}$	0.8	0.00	0.88	0.10
$k_{11}$	0.7	0.68	>200	0.03
$k_{12}$	4.9	2.63	5.19	0.06
$k_{13}$	23.0	22.22	>200	0.03
$k_{14}$	4.5	2.57	4.78	0.06

表 A.2 Scheme I のロバストネス.

Parameter	Nominal Value	$\underline{kj}$	$\bar{kj}$	$DOR_j$
$k_1$	19.7	12.21	>200	0.38
$k_2$	2.6	0.00	8.68	0.70
$k_3$	0.4	0.08	0.49	0.18
$k_4$	1.0	0.00	1.10	0.09
$k_5$	5.1	4.18	25.41	0.18
$k_6$	9.4	1.95	11.64	0.19
$k_7$	2.6	0.90	4.62	0.44
$k_8$	24.9	20.40	124.05	0.18
$k_9$	34.0	21.07	>200	0.38
$k_{10}$	9.4	3.24	16.70	0.44
$k_{11}$	0.8	0.69	4.07	0.14
$k_{12}$	19.7	8.52	23.79	0.17
$k_{13}$	19.7	16.99	100.27	0.14
$k_{14}$	6.0	4.58	8.47	0.24

表 A.3 Scheme Ia のロバストネス.

Parameter	Nominal Value	$\underline{k}_j$	$\bar{k}_j$	$DOR_j$
$k_1$	2.3	1.50	>200	0.35
$k_2$	0.3	0.00	0.44	0.32
$k_3$	0.6	0.00	0.75	0.20
$k_4$	0.6	0.48	>200	0.20
$k_5$	0.6	0.36	20.69	0.40
$k_6$	1.1	0.03	1.83	0.40
$k_7$	0.3	0.01	0.51	0.41
$k_8$	2.9	1.73	100.02	0.40
$k_9$	0.4	0.26	>200	0.35
$k_{10}$	1.1	0.04	1.87	0.41
$k_{11}$	0.7	0.60	78.23	0.14
$k_{12}$	2.3	0.02	2.65	0.13
$k_{13}$	2.3	1.81	>200	0.21
$k_{14}$	0.7	0.05	0.89	0.21
$x_c$	2.0	0.02	2.90	0.31
$\alpha$	20	10.39	>200	0.48

表 A.1, 表 A.2, 表 A.3 及び表 A.4 の通り, 細胞内の分子ネットワークへ適応の効果を導入することで  $DOR$  値が向上し, 分子ネットワークのロバストネスが増大した.

本付録 A におけるロバストネスに関する分析は 1 パラメータでの Hopf 分岐点を解析する分析のみを行った. 多変数によるロバストネスの分析は, Apri ら (Apri *et al.*, 2010) によって提案され, Laub と Loomis によるモデルへと適用され分析されている. Apri らが示している通り, 一般的に, 多変数系のロバストネスに関する研究は 1 パラメータでのロバストネス分析と比較して, 多変数系でのロバストネス分析の方がより生物学的な観点から優れた結果を与えると考えられる. しかし, 細胞性粘菌においては, cAMP シグナルを介した細胞内分子ネットワークと, 拡散する細胞外 cAMP に関する問題の両方を回避できないことから, cAMP の拡散効果を加味せずに系全体のロバストネス分析に関する議論を行い, 正しい結論を得ることは, 困難だと考えられる.

この困難さについては Nagano らによる研究で示されている (Nagano and Maeda, 2012). Apri らは Predator-Prey モデルである Rosenzweig and MacArthur モデルへ, Apri らが提案している多変数系のロバストネス分析を適用している (Apri *et al.*, 2010) が, Nagano らの研究によって, Rosenzweig and MacArthur モデルは, Predator 及び Prey の移動の際, 拡散効果を導入した場合に, カオス的なサブドメインを含む 3 つのサブドメインに分類できることを報告している. つまり, Nagano らの研究から, 系全体のロ

バストネスを議論する際に、拡散効果を加味することが重要であるとの事を示している (Nagano and Maeda, 2012) .

表 A.4 Scheme Ia へ G タンパク質の適応を導入したモデルのロバストネス.

Parameter	Nominal Value	$k_j$	$\bar{k}_j$	$DOR_j$
$k_1$	$2.3 \times 10$	5.6	$3.8 \times 10$	0.39
$k_2$	7.6	3.9	$2.2 \times 10$	0.49
$k_3$	$7.3 \times 10^{-1}$	$6.2 \times 10^{-1}$	1.9	0.15
$k_4$	$4.8 \times 10^{-1}$	0.0	$5.0 \times 10^{-1}$	0.04
$k_5$	$2.3 \times 10$	$1.0 \times 10$	$3.1 \times 10$	0.26
$k_6$	5.4	4.4	$1.9 \times 10$	0.19
$k_7$	4.8	3.8	$2.6 \times 10$	0.21
$k_8$	$2.3 \times 10$	$1.0 \times 10$	$3.1 \times 10$	0.26
$k_9$	5.2	1.3	8.6	0.40
$k_{10}$	$1.6 \times 10$	$1.3 \times 10$	$8.6 \times 10$	0.19
$k_{11}$	$8.5 \times 10^{-1}$	$4.3 \times 10^{-1}$	$9.7 \times 10^{-1}$	0.12
$k_{12}$	$1.0 \times 10$	9.3	$2.8 \times 10$	0.07
$k_{13}$	6.9	3.5	7.8	0.12
$k_{14}$	$1.2 \times 10$	$1.1 \times 10$	$3.1 \times 10$	0.08
$k_{15}$	3.5	1.6	7.2	0.51
$k_{16}$	3.0	2.4	$>2.0 \times 10^2$	0.20
$G_0$	4.0	3.1	5.4	0.23

拡散効果を導入することの重要性について, Kim ら (Kim *et al.*, 2007) は, Laub と Loomis によるモデルについて拡散効果を導入し, 細胞内ネットワーク系のパラメータをランダムにサンプリングすることでそのロバストネスでは, 細胞運動に関するモデリング等はなされなかった. このため, Nagano による細胞動力学に関する研究 (Nagano, 1998) では, cAMP の確率論的な効果や細胞運動を無視せずに扱えるために, 細胞内ネットワークのロバストネスに関して決定的な結論を与える可能性があると考えられる.

## 付録 B マイクロ微細構造を用いた細胞間コミュニケーション

細胞性粘菌の細胞間コミュニケーションを正確に理解するためには、粘菌細胞が行う運動を抑制し、cAMP シグナルを定量的に測定することが必要不可欠である。しかし、粘菌細胞は運動が活発なことや、細胞凝集を終えると共に cAMP の分泌を停止するため、数時間に渡って安定的に cAMP シグナルを定量測定することが困難であり、細胞間コミュニケーションの理解には粘菌の細胞運動を数時間に渡って固定化し、安定的に cAMP シグナルを測定可能な実験手法の開発が必要であった。本付録では、これらの課題を解決するために、粘菌細胞を長時間、安定的に固定化可能な実験的手法を紹介する。

### B1 マイクロ微細構造の構築法

シリコン製基板(平西亨氏作製, 立命館大学マイクロ機械システム工学科小西研究室)を用い、以下の手順によりアガロース上にマイクロ微細構造を構築した。構築したマイクロ微細構造を図 B1.1 に示し、また、その模式図を図 B1.2 に示す。

- (1) Development Buffer ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5mM,  $\text{MgSO}_4$  2mM,  $\text{CaCl}_2$  200 $\mu\text{M}$ , pH 6.2) (Devreotes *et al.*, 1987) に対してアガロース LE (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) を 1.5w/v% 用いた。
- (2) Development Buffer とアガロース LE を混合し、オートクレーブ滅菌した。
- (3) オートクレーブ滅菌後, (2)の液をガラス製シャーレに 10-13mL 分注し, シリコン製基板を貼り付け, 静置した。
- (4) 15 分程度乾燥させ, シリコン製基板を取り除き, マイクロ微細構造を作製した。

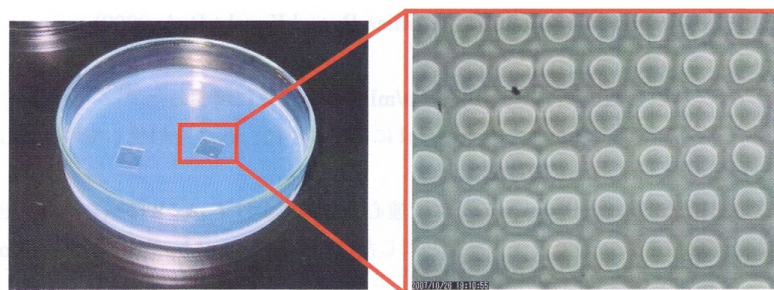


図 B1.1 アガロース上に作製したマイクロ微細構造(左)とその拡大図(右)。マイクロ微細構造は、ウェル直径 50 $\mu\text{m}$ , ウェル中心間距離 75 $\mu\text{m}$ , ウェル深さ 30 $\mu\text{m}$ 。

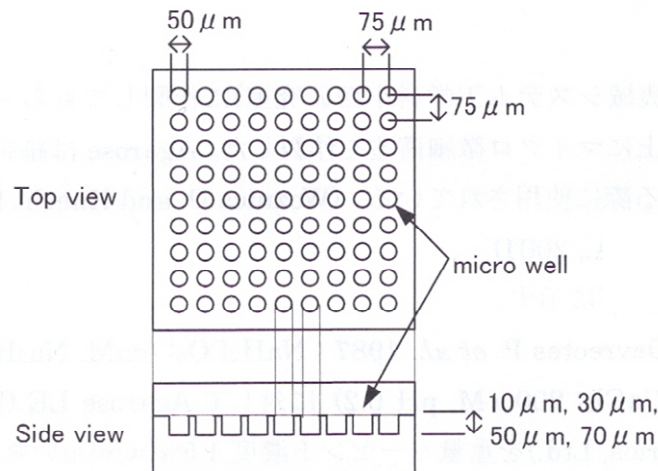


図 B1.2 アガロース上に作製したマイクロ微細構造の模式図.

## B2 実験方法

B2.1 に記載の方法にて粘菌細胞を培養し、B2.2 及び B2.3 に記載の方法で細胞間コミュニケーション測定実験を行った。B2.4 に記載の方法で取得した実験画像のイメージングを行った。

### B2.1 細胞性粘菌の培養

粘菌細胞は AX2 株を用いた。AX2 株の培養には HL5 培地(Glucose 15.4g/L, Bacto Proteose Peptone(Difco) 14.3g/L, Bacto Yeast Extract(Difco) 7.15g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.28g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.485g/L, Distilled Water 1L)を用いて無菌的に培養した(Sussman, 1987) (Watts and Ashworth, 1970) 。培養には、22°C, 120rpm の条件を用いて振とう培養した。

### B2.2 細胞性粘菌の準備

粘菌細胞の細胞間コミュニケーションを測定するために、Devreotes ら及び Woznica らの報告を参考に(Devreotes *et al.*, 1987) (Woznica and Knecht, 2006) , 以下の手順に従って準備した。

- (1) HL5 を用いて  $5 \times 10^6$  cells/mL となるように培養した。
- (2) 最終的な細胞密度が  $2 \times 10^7$  cells/mL となるように、粘菌細胞を遠心チューブへと分注した。
- (3)  $\times 612g$  (2100rpm), 5min の条件で遠心分離し、粘菌細胞を沈殿させた。
- (4) 上澄み液を捨て、(2)で用いた量と同量の Development Buffer を用いて、ボルテックスミキサーで十分攪拌した。
- (5) 再度、 $\times 612g$  (2100rpm), 5min の条件で遠心分離し、粘菌細胞を沈殿させた。

(6) 上澄み液を捨て、Development Buffer を 1mL 分注し、22℃、120rpm で 6-7 時間振とうした。

### B2.3 マイクロ微細構造での細胞間コミュニケーションの測定

Narishige PC-10 及びパイレックスガラス管(外径 1.5mm, 内径 1.17mm)を用いて、内径 50 $\mu$ m 以下となるようにガラスニードルを作製した。準備した粘菌細胞をガラスニードルに満たし、あらかじめ準備したマイクロ微細構造へマニピレータを用いてインジェクションした。このとき、粘菌細胞を 4 $\times$ 4 の四角形状になるように配置し、細胞間コミュニケーションの測定を行った。

### B2.4 マイクロ微細構造での細胞間コミュニケーションのイメージング

オリンパス CKX41 倒立顕微鏡を用いて撮影した。デジタルカメラは Imaging source DMK41AF02 を用いた。カメラの露出は 100-200ms。撮影間隔は 7s。観察用 PC へ 640 $\times$ 480 ピクセル画像として取り込み撮影した。分析には、Image-Pro Plus を用いた。撮影した画像は、取り込み時のノイズを取り除くために 3 画像間での平均化操作を行った。平均化操作の後、画像間の差分を取得し、差分画像を取得した。

## B3 細胞間コミュニケーション

アガロース上に作製したマイクロ微細構造に、4 $\times$ 4 の四角形状になるように粘菌細胞を配置した。この差分画像、差分画像を取得後に対数スケールによるカラーリングをした画像及び計算機シミュレーション予想(Nagano, 2000a)をそれぞれ図 B3.1, 図 B3.2 及び図 B3.3 として示す。

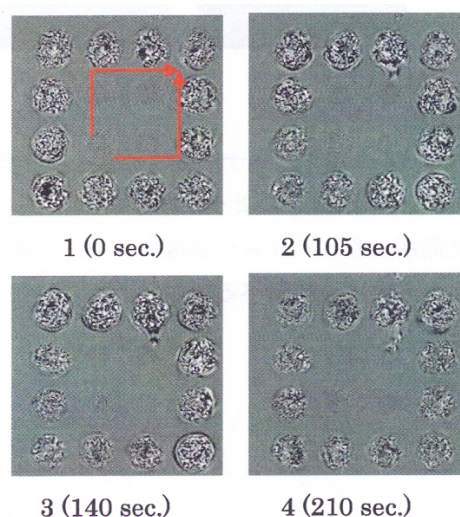


図 B3.1 マイクロ微細構造内に粘菌細胞を閉じ込めた画像。円形に配置されているものが粘菌細胞の塊。図は取得した画像から画像間で差分処理を行い、差分画像を取り出した。シグナル(白色の部分)が図左下から発生し、二手に分かれて、図右上で衝突して消滅している。



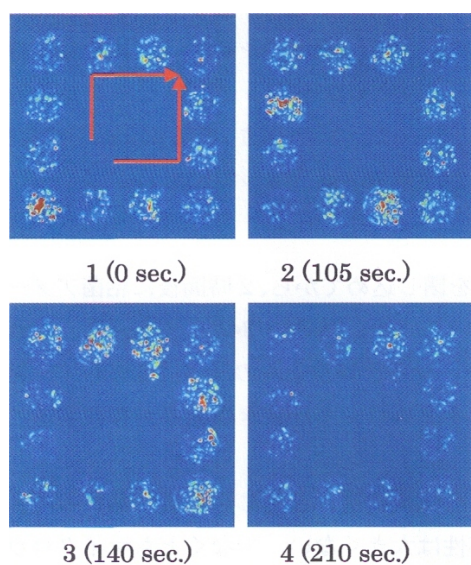


図 B3.2 図 B3.1 を対数スケールでカラーリングした画像．シグナル(赤色)が図左下から発生し二手に分かれて図右上で衝突して消滅している．赤：細胞運動が最大の箇所．青：細胞運動が最小の箇所．

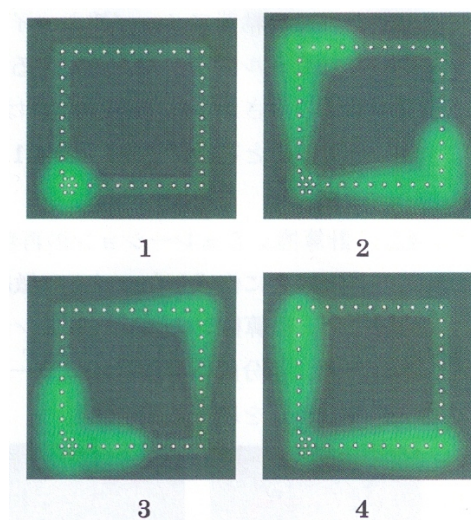


図 B3.3 計算機上での粘菌細胞の細胞間コミュニケーションのシミュレーション(Nagano, 2000a より引用)．図左下から cAMP パルスが生じて二手に分かれ，図右上で cAMP パルスが衝突して消滅している．白丸：固定化された 1 つの粘菌細胞．緑色の濃淡：伝播する cAMP の拡散を緑色の濃淡で示している．

シリコン製基板及びアガロースを用いたことで，数細胞の粘菌細胞による定量化実験法を構築した．さらに，粘菌細胞をマイクロ微細構造へ閉じ込めることで細胞間コミュニケーションを測定し，パルス状の cAMP シグナルを抽出することに成功した．本付録では，マイクロ微細構造中に閉じ込められた粘菌アメーバの塊を擬似的に 1 細胞と仮定し，細胞間コミュニケーション測定を行った．このため，測定結果が計算機シミュレーションによる予想と一致するという定性的な結果を得たのみであった．今後，細胞間コミュニケーションを定量化するためには，FRET 技術を用いた細胞内 cAMP シグナルを測定可能にすること(DiPilato *et al.*, 2004) (Gregor *et al.*, 2010) が必要であると考えられ，上條の研究及び水谷の研究によって，マイクロ微細構造を用いた細胞性粘菌の cAMP シグナルの定量測定系が構築されつつある状況である (上條, 2013) (水谷, 2013) ．

## 引用文献

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> edition, New York, Garland Science.
- Apri, M., Molenaar, J., de Gee, M., van Voorn, G., 2010, Efficient Estimation of The Robustness Region of Biological Models with Oscillatory Behavior, *PLoS ONE*, **5**, e9865.
- Aubry, L., Maeda, M., Insall, R., Devreotes, P.N., Firtel, R.A., 1997, The *Dictyostelium* Mitogen-activated Protein Kinase ERK2 is Regulated by Ras and cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) and Mediates PKA Function, *J. Biol. Chem.*, **272**, 3883-3886.
- Beug, H., Gerisch, G., Kempff, S., Riedel, V., Cremer, G., 1970, Specific Inhibition of Cell Contact Formation in *Dictyostelium* by Univalent Antibodies, *Exp. Cell Res.*, **63**, 147-158.
- Beug, H., Katz, F.E., Gerisch, G., 1973, Dynamics of Antigenic Membrane Sites Relating to Cell Aggregation in *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Biol.*, **56**, 647-658.
- Brar, S.K., Siu, C.H., 1993, Characterization of the Cell Adhesion Molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 24902-24909.
- Devreotes, P.N., 1983, Cyclic Nucleotides and Cell-cell Communication in *Dictyostelium discoideum*, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **15**, 55-96.
- Devreotes, P.N., Fontana, D., Klein, P., Sherring, J., Theibert, A., 1987, Transmembrane Signaling in *Dictyostelium*, *Method Cell Biol.*, **28**, 299-331.
- Dhooge, A., Govaerts, W., Kuznetsov, Y.A., 2003, MATCONT: a MATLAB Package for Numerical Bifurcation Analysis of ODEs, *ACM Trans. Math. Software*, **29**, 141-164.
- DiPilato, L.M., Cheng, X., Zhang, J., 2004, Fluorescent Indicators of cAMP and Epac Activation Reveal Differential Dynamics of cAMP Signaling within Discrete Subcellular Compartment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 16513-16518.
- Dormann, D., Kim, J.Y., Devreotes, P.N., Weijer, C.J., 2001, cAMP Receptor Affinity Controls Wave Dynamics, Geometry and Morphogenesis in *Dictyostelium*, *J. Cell Sci.*, **114**, 2513-2523.
- Dworkin, M., Keller, K.H., 1977, Solubility and Diffusion Coefficient of Adenosine 3':5'-Monophosphate, *J. Biol. Chem.*, **252**, 864-865.
- Firtel, R.A., 1996, Interaction Signaling Pathways Controlling Multicellular Development in *Dictyostelium*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **6**, 545-554.
- Gerisch, G., Wick, U., 1975, Intracellular Oscillations and Release of Cyclic AMP from *Dictyostelium* cells, *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, **65**, 346-370.
- Gregor, T., Fujimoto, K., Masaki, N., Sawai, S., 2010, The Onset of Collective Behavior in Social Amoebae, *Science*, **328**, 1021-1025.
- Gross, J.D., Peacey, M.J., Trevan, D.J., 1976, Signal Emission and Signal Propagation during

- Early Aggregation in *Dictyostelium discoideum*, *J. Cell Sci.*, **22**, 645-656.
- Halloy, J., Lauzeral, J., Goldbeter, A., 1998, Modeling Oscillations and Waves of cAMP in *Dictyostelium discoideum* cells, *Biophys. Chem.*, **72**, 9-19.
- Hereld, D., Vaughan, R., Kim, J.Y., Borleis, J., Devreotes, P.N., 1994, Localization of Ligand-induced Phosphorylation Sites to Serine Clusters in the C-terminal Domain of the *Dictyostelium* cAMP Receptor, cAR1, *J. Biol. Chem.*, **269**, 7036-7044.
- Huang, W., Ramsey, K.M., Marcheva, B., Bass, J., 2011, Circadian Rhythms, Sleep, and Metabolism, *J. Clin. Invest.*, **121**, 2133-2141.
- Huang, Y.E., Iijima, M., Parent, C.A., Funamoto, S., Firtel, R.A., Devreotes, P.N., 2003, Receptor-mediated Regulation of PI3Ks Confines PI(3,4,5)P<sub>3</sub> to the Leading Edge of Chemotaxing Cells, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1913-1922.
- Insall, R., 2003, *Dictyostelium* Chemotaxis: Fascism Through the Back Door?, *Curr. Biol.*, **13**, R353-R354.
- Janetopoulos, C., Jin, T., Devreotes, P.N., 2001, Receptor-Mediated Activation of Heterotrimeric G-Proteins in living cells, *Science*, **291**, 2408-2411.
- Johnson, R.L., VanHaastert, P.J.M., Kimmel, A.R., Saxe III, C.L., Jastorff, B., Devreotes, P.N., 1992, The Cyclic Nucleotide Specificity of Three cAMP Receptors in *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.*, **267**, 4600-4607.
- Kawata, M., Suzuki, R., 1980, Two Coupled Neural Oscillations as a Model of the Circadian Pacemakers, *J. Theor. Biol.*, **86**, 547-575.
- Kesbeke, F., Snaar-Jagalska, B.E., Van Haastert, P.J.M., 1988, Signal Transduction in *Dictyostelium* *fgdA* Mutants with a Defective Interaction between Surface cAMP Receptors and a GTP-binding Regulatory Protein, *J. Cell. Biol.*, **107**, 521-528.
- Kessin, R.H., 2001, *Dictyostelium* Evolution, Cell Biology, and the Development of Multicellularity, Cambridge University Press.
- Kim, J., Heslop-Harrison, P., Postlethwaite, I., Bates, D.G., 2007, Stochastic Noise and Synchronization During *Dictyostelium* Aggregation Make cAMP Oscillations Robust, *PLoS Comput. Biol.*, **3**, e218
- Kim, J.Y., Soede, R.D., Schaap, P., Valkema, R., Borleis, J.A., VanHaastert, P.J., Devreotes, P.N., Hereld, D., 1997, Phosphorylation of Chemoattractant Receptors is Not Essential for Chemotaxis or Termination of G-Protein-Mediated Responses, *J. Biol. Chem.*, **272**, 27313-27318.
- Klein, P., Vaughan, R., Borleis, J., Devreotes, P.N., 1987, The Surface Cyclic AMP Receptor in *Dictyostelium* – Levels of Ligand-induced Phosphorylation, Solubilization, Identification of Primary Transcript, and Developmental Regulation of Expression, *J. Biol. Chem.*, **262**, 358-364.

- Klein, P., Theibert, A., Devreotes, P.N., 1988, Identification and Ligand Induced Modification of the cAMP Receptor in *Dictyostelium*, *Methods Enzymol*, **159**, 267-278.
- Knecht, D.A., Fuller, D.L., Loomis, W.F., 1987, Surface Glycoprotein, gp24, Involved in Early Adhesion of *Dictyostelium discoideum*, *Dev. Biol.*, **121**, 277-283.
- Knetsch, M.L.W., Epskamp, S.J.P., Schenk, P.W., Wang, Y.W., Segall, J.E., Snaar-Jagalska, B.E., 1996, Dual Role of cAMP and Involvement of Both G-protein and Ras in Regulation of ERK2 in *Dictyostelium discoideum*, *EMBO J.*, **15**, 3361-3368.
- Kumagai, A., Hadwiger, J. A., Pupillo, M., and Firtel, R.A., 1991, Molecular Genetic Analysis of Two Glapha Protein Subunits in *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.*, **266**, 1220-1228.
- Kuspa, A., and Loomis, W.F., 1992, Tagging Development Genes in *Dictyostelium* by Restriction Enzyme-mediated Integration of Plasmid DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 8803-8807.
- Laub, M.T., Loomis, W.F., 1998, A Molecular Network That Produces Spontaneous Oscillations in Excitable Cells of *Dictyostelium*, *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3521-3532.
- Lee, K.J., Cox, E.C., Goldstein, R.E., 1996, Competing Patterns of Signaling Activity in *Dictyostelium discoideum*, *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 1174-1177.
- Lee, K.J., Goldstein, R.E., Cox, E.C., 2001, Resetting Wave Forms in *Dictyostelium* Territories, *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 068101-1-068101-4.
- Loomis, W.F., 1996, Genetic Network That Regulate Development in *Dictyostelium* cells, *Microbiol. Rev.*, **60**, 135.
- Ma, L., Iglesias, P.A., 2002, Quantifying Robustness of Biochemical Network Models, *BMC Bioinformatics*, **3**, 38.
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C., Devreotes, P.N., Firtel, R.A., 1996, Seven Helix Chemoattractant Receptors Transiently Stimulation Mitogen-activated Protein Kinase in *Dictyostelium*-role of Heterotrimeric G Proteins, *J. Biol. Chem.*, **271**, 3351-3354.
- Maeda, M., Lu, S., Shaulsky, G., Miyazaki, Y., Kuwayama, H., Tanaka, Y., Kuspa, A., Loomis, W.F., 2004, Periodic Signaling Controlled by an Oscillatory Circuit That Includes Protein Kinases ERK2 and PKA, *Science*, **304**, 875-878.
- Malchow, D., Nagele, B., Schwartz, H., Gerisch, G., 1972, Membrane-bound Cyclic AMP Phosphodiesterase in Chemotactically Responding Cells to *Dictyostelium discoideum*, *Eur. J. Biochem.*, **28**, 136-142.
- Martiel, J.L., Goldbeter, A., 1987, A Model Based on Receptor Desensitization for Cyclic AMP Signaling in *Dictyostelium*, *Biophys. J.*, **52**, 807-828.
- Muller, K., Gerisch, G., 1978, A Specific Glycoprotein as the Target Site of Adhesion Blocking Fab in Aggregating *Dictyostelium* Cells, *Nature*, **274**, 445-449.
- Muller, K., Gerisch, G., Fromme, I., Mayer, H., Tsugita, A., 1979, A Membrane Glycoprotein of

- Aggregating *Dictyostelium* Cells with the Properties of Contact Sites, *Eur. J. Biochem.*, **99**, 419-426.
- Mutzel, R., Lacombe, M.L., Simon, M.N., De Gunzburg, J., Veron, M., 1987, Cloning and cDNA Sequence of the Regulatory Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase from *Dictyostelium discoideum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 6-10.
- Nagano, S., 1998, Diffusion-Assisted Aggregation and Synchronization in *Dictyostelium discoideum*, *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 21, 4826-4829.
- Nagano, S., 2000a, Modeling the Model Organism *Dictyostelium discoideum*, *Dev. Growth. Differ.*, **42**, 541-550.
- Nagano, S., 2000b, Receptor-Product Coupling Scheme for The Robust Synchronization of Limit Cycle Oscillator, *Prog. Theor. Phys.*, **103**, 229-244.
- Nagano, S., 2003, Receptors as a Master Key for Synchronization of Rhythms, *Phys. Rev. E*, **67**, 056215.
- Nagano, S., Maeda, Y., 2012, Phase Transitions in Predator-Prey Systems, *Phys. Rev. E*, **85**, 011915.
- Palsson, E., Cox, E.C., 1996, Origin and Evolution of Circular Waves and Spirals in *Dictyostelium discoideum* territories, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1151-1155.
- Pitt, G.S., Milona, N., Borleis, J., Lin, K.C., Reed, R.R., Devreotes, P.N., 1992, Structurally Distinct and Stage-specific Adenylyl Cyclase Genes Play Different Roles in *Dictyostelium* Development, *Cell*, **69**, 305-315.
- Sakurai, S., Kimura, R., Nagano, S., Hiranishi, T., Konishi, S., 2006, External of the Metabolism and the Cellular Communication by the Newly Developed Micro-Grid System, Progress on post-technologies – Proceeding of the 4'th international forum of post-genome technologies, 495-501.
- Sawai, S., Thomason, P.A., Cox, E.C., 2005, An Autoregulatory Circuit for Long-Range Self-Organization in *Dictyostelium* cell populations, *Nature*, **433**, 323-326.
- Segall, J.E., Kuspa, A., Shaulsky, G., Ecke, M., Maeda, M., Gaskins, C., Firtel, R.A., Loomis, W.F., 1995, A MAP Kinase Necessary for Receptor-mediated Activation of Adenylyl Cyclase in *Dictyostelium*, *J. Cell. Biol.*, **128**, 405-413.
- Shaulsky, G., Fuller, D., Loomis, W.F., 1998, A cAMP-phosphodiesterase Controls PKA-dependant Differentiation, *Development*, **125**, 691-699.
- Siebert, F., Weijer, C., 1989, Digital Image Processing of Optical Density Wave Propagation in *Dictyostelium discoideum* and Analysis of the Effects of Caffeine and Ammonia, *J. Cell Sci.*, **93**, 325-335.
- Simon, M. N., Pelegri, O., Veron, M., Kay, R.R., 1992, Mutation of Protein Kinase-A Cause Heterochronic Development of *Dictyostelium*, *Nature*, **356**, 171-172.

- Sussman, M., 1987, Cultivation and Synchronous morphogenesis of *Dictyostelium* Under Controlled Experimental Conditions, *Method Cell Biol.*, **28**, 9-29.
- Tang, Y., Othmer, H.G., 1995, Excitation, Oscillations and Wave Propagation in a G-Protein-Based Model of Signal Transduction in *Dictyostelium discoideum*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **349**, 179-195.
- Theibert, A., Devreotes, P.N., 1983, Cyclic 3', 5'-AMP Relay and *Dictyostelium discoideum*: Adaptation Is Independent of Activation of Adenylate Cyclase, *J. Cell Biol.*, **97**, 173-177.
- Watts, D.J., Ashworth, J.M., 1970, Growth of Myxamoebae of the Cellular Slime Mold *Dictyostelium discoideum* in axenic culture, *Biochem. J.*, **119**, 171-174.
- Weeks, G., Spiegelman, G.B., 2003, Poles Played by Ras Subfamily Proteins in the Cell and Developmental Biology of Microorganisms, *Cell Signal*, **15**, 901-909.
- Winfree, A.T., 1980, The Geometry of Biological Time, Springer-Verlag, Biomathematics, Vol. **8**.
- Wong, L.M., Siu, C.H., 1986, Cloning of cDNA for the Contact Site A Glycoprotein of *Dictyostelium discoideum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4248-4252.
- Woznica, D., Knecht, D.A., 2006, Under-Agarose Chemotaxis of *Dictyostelium discoideum*, *Method Cell Biol.*, **346**, 311-325.
- 上條和, 2013, スーパーマイクロウェル実験系を用いた細胞性粘菌の cAMP パルスに関する研究, 立命館大学大学院 2013 年度修士論文.
- 櫻井俊輔, 2007, マイクロ実験系を用いた細胞性粘菌の細胞間コミュニケーションに関する研究, 立命館大学大学院 2007 年度修士論文.
- 水谷陽祐, 2013, FRETを用いた細胞間コミュニケーション分子 cAMP の定量測定に関する研究, 立命館大学大学院 2013 年度修士論文.